

Antivirale Wirksamkeit des Chemokinrezeptorhemmstoffs 1,1'-bis-1,4,8,11-tetra-azazyklo-tetradekan bei Katzen mit feliner Immunschwächevirusinfektion

Christiane Stengel

Aus der Medizinischen Tierklinik
Lehrstuhl für Innere Krankheiten, Dermatologie und Neurologie der kleinen
Haustiere sowie für klinische Labordiagnostik der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Klee

Angefertigt unter der wissenschaftlichen Leitung von
Priv.-Doz., Dr. med. vet., Dr. habil. Katrin Hartmann

**Antivirale Wirksamkeit des Chemokinrezeptorhemmstoffs 1,1'-bis-
1,4,8,11-tetra-azacyklo-tetradekan bei Katzen mit feline
Immunschwächevirusinfektion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Christiane Stengel
Merzig

München 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referentin:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann
Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	2
1. Aufbau und Replikation von Lentiviren	2
1.1. Aufbau des feline Immunschwächevirus	2
1.1.1. Strukturgene und ihre Produkte	4
1.1.2. Weitere Gene	5
1.2. Viraler Replikationszyklus	7
1.2.1. Viruseintritt in die Zelle	7
1.2.2. Reverse Transkription und Integration	8
1.2.3. Transkription und Translation	9
1.2.4. Zusammenbau und Knospung	10
2. Rezeptoren	12
2.1. Chemokine und Rezeptoren	12
2.1.1. Chemokine	12
2.1.1.1. Struktur	13
2.1.1.2. Funktion	15
2.1.2. Chemokinrezeptoren	15
2.1.2.1. CXC-Rezeptoren	18
2.1.2.1.1. CXCR4	19
2.1.2.1.2. CXCR5	20
2.1.2.1.3. CXCR6	21
2.1.2.2. CC-Rezeptoren	22
2.1.2.2.1. CCR1	23
2.1.2.2.2. CCR2	23
2.1.2.2.3. CCR3	24
2.1.2.2.4. CCR5	24
2.1.2.2.5. CCR8	25
2.1.2.3. Andere Rezeptoren	25
2.1.2.3.1. CX3CR1	26
2.1.2.3.2. XCR1	26
2.2. Korezeptoren für HIV- und FIV-Infektion	27
2.2.1. Mutationen in Rezeptoren oder Liganden	28
2.2.1.1. CCR5	28
2.2.1.2. Andere Rezeptoren	29
2.2.1.3. SDF-1	30
2.2.2. Hemmstoffe der Korezeptoren	30
2.2.2.1. CCR5	31
2.2.2.1.1. Monoklonale Antikörper	31
2.2.2.1.2. Chemokine und Chemokinderivate	31
2.2.2.1.3. Niedermolekulare Nicht-Peptidmoleküle	32
2.2.2.2. CXCR4	33
2.2.2.2.1. Monoklonale Antikörper	33
2.2.2.2.2. Chemokine und Chemokinderivate	34
2.2.2.2.3. Kleine Peptide und Nicht-Peptidmoleküle	34

III. Eigene Untersuchungen	39
1. Material	39
1.1. Tiere	39
1.1.1. Einschlusskriterien	39
1.1.2. Signalement	40
1.2. Medikamente	42
1.2.1. PMEA	42
1.2.2. AMD3100	42
1.2.3. Placebo	43
2. Methoden	43
2.1. Voruntersuchung	43
2.1.1. Durchführung	44
2.1.2. Untersuchungen	44
2.2. Therapiestudie	45
2.2.1. Auswahl der Katzen	45
2.2.2. Aufbau der Studie	46
2.2.3. Parameter zur Beurteilung der Wirksamkeit	47
2.2.3.1. Klinische Parameter	47
2.2.3.1.1. Körpermasse	48
2.2.3.1.2. Karnofsky-Index	48
2.2.3.1.3. Entzündungen der Maulhöhle	49
2.2.3.1.4. Konjunktivitis	50
2.2.3.2. Labordiagnostische Parameter	50
2.2.3.2.1. Hämatologische Parameter	51
2.2.3.2.2. Klinisch-chemische Laborparameter	51
2.2.3.3. Immunologische Parameter	52
2.2.3.3.1. Markierung der Zellen	52
2.2.3.3.2. Untersuchung im Durchflußzytometer	53
2.2.3.3.3. Berechnung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen	54
2.2.3.4. Virologische Parameter	56
2.2.3.4.1. Probenvorbereitung	56
2.2.3.4.2. Prinzip der real-time Polymerasekettenreaktion	58
2.2.3.4.3. Primer und Sonden	59
2.2.3.4.4. Auswertung der Fluoreszenzsignale	60
2.3. Untersuchungen zur Resistenzentwicklung	62
2.3.4.1. Probengewinnung	62
2.3.4.2. Herstellen der Lymphozytenkulturen	62
2.3.4.3. Hemmung der Virusreplikation <i>in vitro</i>	63
2.3.5. Statistische Auswertung	63

IV. Ergebnisse	64
1. Prävalenz der FIV-Infektion	64
2. Voruntersuchung	64
3. Therapiestudie	66
3.1. Klinische Parameter	66
3.1.1. Körpermasse	66
3.1.2. Karnofsky-Index	67
3.1.3. Entzündungen der Maulhöhle	68
3.1.4. Konjunktivitis	69
3.2. Labordiagnostische Parameter	70
3.2.1. Hämatologische Parameter	70
3.2.1.1. Erythrozytenzahl	70
3.2.1.2. Hämoglobin	72
3.2.1.3. Hämatokrit	74
3.2.1.4. Leukozyten	75
3.2.1.5. Neutrophile Granulozyten	76
3.2.1.6. Lymphozyten	78
3.2.2. Klinisch-chemische Laborparameter	79
3.2.2.1. Leberwerte	79
3.2.2.2. Nierenwerte	79
3.2.2.3. Proteine	79
3.2.2.4. Serum-Elektrolyte	79
3.2.2.4.1. Magnesium	80
3.2.2.4.2. Kalzium	81
3.3. Immunologische Parameter	82
3.3.1. Relative CD4 ⁺ -Lymphozyten	82
3.3.2. Absolute CD4 ⁺ -Lymphozyten	84
3.3.3. Relative CD8 ⁺ -Lymphozyten	85
3.3.4. Absolute CD8 ⁺ -Lymphozyten	85
3.3.5. CD4/CD8-Quotient	86
3.4. Virologische Parameter	87
3.4.1. Absoluter Proviral Load	87
3.4.2. Relativer Proviral Load	88
3.4.3. Absoluter Viral Load	90
3.4.4. Relativer Viral Load	91
3.5. Hemmung der Virusreplikation <i>in vitro</i>	92

Inhaltsverzeichnis	IV
V. Diskussion	93
1. Prävalenz der FIV-Infektion	93
2. Therapiestudie	94
2.1. Patienten	94
2.1.1. Klinische Parameter	95
2.1.2. Labordiagnostische Parameter	96
2.1.3. Immunologische Parameter	97
2.1.4. Virologische Parameter	98
2.2. Beurteilung der Medikamente	99
2.2.1. PMEa	99
2.2.1.1. Nebenwirkung	99
2.2.1.2. Wirksamkeit	100
2.2.2. AMD3100	102
2.2.2.1. Nebenwirkungen	102
2.2.2.2. Wirksamkeit	103
2.2.2.3. Resistenzentwicklung <i>in vivo</i>	104
2.2.3. Kombinationstherapie	105
VI. Zusammenfassung	106
Summary	107
VII. Literaturverzeichnis	
VIII. Anhang	
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AMD3100	1,1'-Bis-1,4,8,11-tetraazazyklotetradekan
ANP	azyklische Nukleosidphosphonate
AP	alkalische Phosphatase
AST	Aspartataminotransferase
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Kapsidprotein
CC	β-Chemokin
CCR1 bis 9	CC-Chemokinrezeptor 1 bis 9
CD	cluster designation
CD4 ⁺ -Zelle	CD4-Rezeptor-tragende Zelle
CD8 ⁺ -Zelle	CD8-Rezeptor-tragende Zelle
CK	Kreatinkinase
CrFK-Zellen	Crandell-Feline-Kidney-Zellen
C _T -Wert	Threshold-Cycle
CXC	α-Chemokin
CXCR1 bis 6	CXC-Chemokinrezeptor-1 bis 6
Cys	Cystein
D	Dalton
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERL	Tripeptidfolge Glutamat-Leucin-Arginin
et al.	et alteri
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothioyanat
FIV	felines Immunschwächevirus
g	Gramm
g120	Oberflächenprotein, bindet an Wirtszelle
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
gp	Glykoprotein
HIV	humanes Immunschwächevirus
HIV-1	humanes Immunschwächevirus, Typ 1
HIV-2	humanes Immunschwächevirus, Typ 2
IFN γ	Interferon γ
IL-2 bis 8	Interleukin 1 bis 8
IN	Integrase
IU	internationale Einheiten
iv.	intravenös
kD	kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
LDH	Laktat-Dehydrogenase
log-Stufen	Einteilung nach Zehnerpotenz
LTR	Long Terminal Repeat
LTNP	long-term non progressors

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
m	männlich
mAk	monoklonaler Antikörper
MA	Matrixprotein
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumion
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
Mio.	Millionen
mk	männlich-kastriert
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
Mouse IgG	Mäuseimmunglobulin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
M-Trop	Makrophagen bevorzugend
NC	Nukleokapsidprotein
ng	Nanogramm
NK	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-terminal	Amino-Ende eines Proteins
ORF	Open reading frame
p	Übergangswahrscheinlichkeit, Schwellenwert
p24	Virales Antigen des Kapsidprotein
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen

pbs	primer-binding-site
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PMEA	9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin
PR	Protease
QT-Strecke	Abstand zwischen Q- und T-Wellen im EKG
RANTES	Regulated-upon-Activation Normal T Expressed and Secreted
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseH	Ribonuklease H
RT	Reverse Transkriptase
sc.	subkutan
SDF-1	stromal cell-derived factor
SH	Sulphydrylseitenkette
SIV	Immunschwächevirus der Affen
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SU	Oberflächenprotein
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
Th1-Zelle	T-Helfer-Zelle Typ 1
Th2-Zelle	T-Helfer- Zelle Typ 2
TM	Transmembranprotein
tRNA	Transfer-RNA
T-trop	T-Zellen bevorzugend
U	Einheiten (Units)
U/min	Umdrehungen pro Minute

V1-5	variabel Regionen 1-5
w	weiblich
wk	weiblich-kastriert
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
7-TMD	sieben Transmembrandomänen

I. Einleitung

Das humane Immunschwächevirus (HIV) verursacht eine Krankheit des Immunsystems, das erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS). AIDS ist das Endstadium einer Infektionskrankheit, die durch eine lange symptomfreie Zeit gekennzeichnet ist. Seit der Identifizierung im Jahre 1983 durch BARRÉ-SINOUSI und Mitarbeiter sind das HIV und AIDS im Mittelpunkt der Medien und des öffentlichen Interesses. Mittlerweile ist AIDS weltweit die vierthäufigste Todesursache. Im Jahr 2002 starben dem Bericht der Joint United Nations Programme on HIV/AIDS zufolge 3,2 Mio. Menschen an den Folgen von HIV und AIDS; die Zahl der Neuinfizierten lag bei 5 Mio. und nahm damit keineswegs ab, sondern stagniert trotz jahrelanger Aufklärungskampagnen. Derzeit leben 42 Millionen Menschen mit HIV, davon 3,2 Mio. Kinder unter 15 Jahren. Im Durchschnitt ist jeder 100. der zwischen 15- bis 49-jährigen HIV-infiziert (FLINT, 2000). Es besteht nach wie vor dringender Forschungsbedarf in der Entwicklung und Erprobung kostengünstiger, neuer und besserer antiretroviraler Medikamente. Tiermodelle liefern wichtige Erkenntnisse über deren Wirksamkeit und Verträglichkeit.

1986 entdeckten PEDERSEN und Mitarbeiter das feline Immunschwächevirus FIV. Seither wurde die FIV-Infektion als Tiermodell für die Erprobung neuer Medikamente etabliert (KOOLEN et al., 1989; EGBERINK, 1991). Klinische Studien an natürlich FIV-infizierten Katzen konnten die Wirksamkeit antiretroviraler Substanzen nachweisen und damit einen wichtigen Beitrag zur Auswahl der Medikamente für klinische Studien in der Humanmedizin leisten. Auch die Tiermedizin und die von der FIV-Infektion betroffenen Katzen können von neuen Entwicklungen der Arzneimittelentwicklung profitieren.

Neue Angriffspunkte retroviraler Therapie sind die Chemokinrezeptoren, die von HIV und FIV zur Infektion der Wirtszelle verwendet werden. Bizyklame, eine neue Klasse von Molekülen, die spezifisch den Chemokinrezeptor CXCR4 blockieren, sind wirksam gegen HIV und FIV *in vitro* (DONZELLA et al., 1998; EGBERINK et al., 1999). Ziel dieser Arbeit war es, die Effektivität und eventuell auftretende Nebenwirkungen des CXCR4-Chemokin-Rezeptorhemmstoffes (1,1'-[1,4-phenylen-bis(methylen)]bis-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (AMD3100) bei natürlich FIV-infizierten Katzen zu untersuchen.

II. Literaturübersicht

1. Aufbau und Replikation von Lentiviren

FIV ist ein Lentivirus aus der Familie der Retroviren. Die Klassifizierung als Lentivirus erfolgte aufgrund charakteristischer Eigenschaften, wie der Morphologie, der Genomstruktur und -organisation, dem Tropismus für Zellen der Monozyten-/Makrophagen-Reihe und für T-Lymphozyten. Außerdem besitzt FIV die Mg^{2+} -abhängige Reverse Transkriptase, ein Enzym, das die Umschreibung der viralen RNA in DNA katalysiert. FIV persistiert nach Infektion des Wirtes lebenslang (OLMSTED et al., 1989a; OLMSTED et al., 1989b; PEDERSEN et al., 1989; TALBOTT et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989; MIYAZAWA und MIKAMI, 1993).

1.1. Aufbau des felines Immunschwächevirus

FIV ist ein sphärisches bis ellipsoides Viruspartikel mit einem Durchmesser von 105 bis 125 nm, aus dessen Oberfläche wenig erhabene Hüllprojektionen ragen (PEDERSEN et al., 1987) (Abb. 1). Es enthält einen, von einer Matrix umgebenen Innenkörper, der das virale Genom beherbergt (YAMAMOTO et al., 1988). Im Gegensatz zu den annähernd sphärischen Innenkörpern (Kapsid) der anderen Retroviren gleicht der der Lentiviren einem konisch geformten Zylinder (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 1988; HARTMANN, 1998). Er wird durch das Kapsidprotein (p24) gebildet und umgibt das virale Genom, ein Dimer aus zwei Kopien einer positiven Einzelstrang-Ribonukleinsäure (RNA), an die das Nukleokapsidprotein (NC) eng gebunden ist. Ebenfalls an die RNA gebunden sind die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR). Umgeben wird der Innenkörper vom Matrixprotein (MA), das der äußeren Form des Virions, dem vollständigen, für die Wirtszelle infektiösen Virus, die Stabilität verleiht (DAVIS und CLEMENTS, 1989; CLEMENTS und PAYNE, 1994). Die Virushülle wird aus einer, ursprünglich aus der Zellmembran stammenden, Lipiddoppelschicht gebildet, in deren Oberfläche virale Proteine eingelagert sind. Bei diesen Oberflächenproteinen handelt es sich um zwei Glykoproteine, das Transmembranprotein (TM) mit einem Molekulargewicht von 41 kD (gp41), und das Oberflächenprotein (SU), dessen Molekulargewicht mit 120

kD (gp120) angegeben wird (EGBERINK et al., 1990; VERSCHOOR et al., 1993).

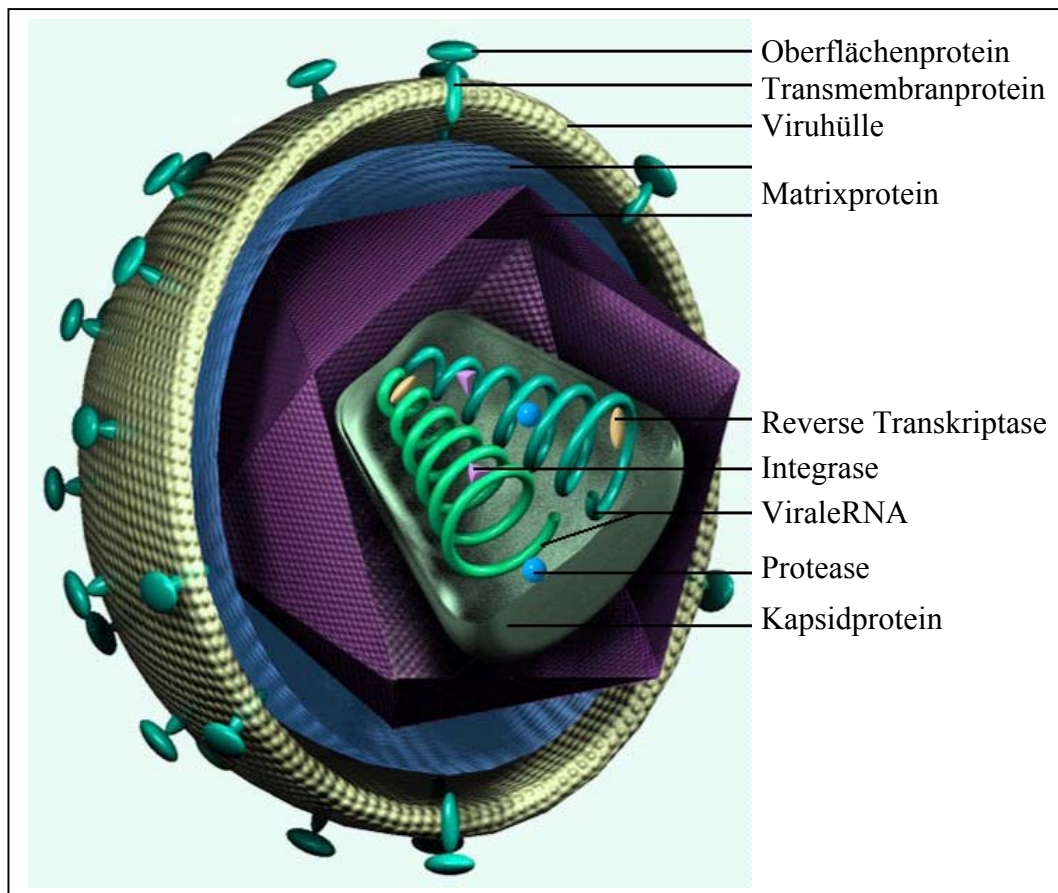


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Lentivirus
(www.vetmed.iastate.edu/.../users/carlap/retrovirus2.jpg, modifiziert)

1.1.1. Strukturgene und ihre Produkte

Lentiviren enthalten zusätzlich zu den allen Retroviren eigenen drei Strukturgenen, *gag* (group specific antigen), *pol* (polymerase) und *env* (envelope), die für die Strukturproteine und einige Enzyme kodieren, eine Anzahl kleiner Gene, sogenannter Open reading frames (ORF). Diese ORF kodieren zusätzliche, artspezifische Enzyme. Bei HIV-1 wurden sechs ORF identifiziert; das FIV-Genom enthält nur drei weitere Gene. Nach MIYAZAWA und Mitarbeiter (1993) besteht das FIV-Provirus aus ca. 9500 Basenpaaren und wird an beiden Enden von Long Terminal Repeats (LTR) flankiert. Die LTR sind Nukleotidsequenzen, die die Synthese und Integration der proviralen DNA steuern (ELDER und PHILLIPS, 1993).

Durch Translation des *gag*-Gens, bei der die genetische Information der DNA in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt wird, entsteht ein Polyprotein (55 kD), aus dem, nach Spaltung durch die virale Protease die drei Strukturproteine des Innenkörpers gebildet werden (CLEMENTS JANICE und ZINK, 1996). Zunächst wird vom N-terminalen Ende das Matrixprotein MA (15 kD) abgespalten und dann in zwei Schritten das Kapsidprotein CA (24 kD) vom Nukleokapsidprotein NC (7 kD) getrennt (EGBERINK et al., 1990; STEINMAN et al., 1990; ELDER und PHILLIPS, 1993). Hierbei entsteht ein Oligopeptid aus neun Aminosäuren, dessen Funktion bisher ungeklärt ist und das dem bei HIV-1 aus zwölf Aminosäuren bestehenden Peptid ähnlich ist (HENDERSON et al., 1992). Durch die zeitliche Abfolge der Spaltungen wird wahrscheinlich die Fähigkeit des NC reguliert, stabile Komplexe mit sich selbst, mit der Zellmembran und mit der viralen RNA zu bilden (ELDER und PHILLIPS, 1993). Bei jedem 20. Translationszyklus liest der Ribosom-RNA-Komplex über den Endpunkt der Gag-kodierenden-mRNA hinaus, wodurch zusätzlich das *pol*-Gen abgelesen wird (MORIKAWA und BISHOP, 1992). Es entsteht ein 158 kD großes Gag-Pol-Vorläuferprotein (MORIKAWA et al., 1991). Die *pol*-Gen kodierten Proteine stellen die Enzymausstattung des Virus dar. Das erste, die PR (13 kD) vermittelt die Spaltung der großen Vorläuferproteine in die funktionsfähigen Proteine. Die RT mit einem Molekulargewicht von 61 kD, in Form eines Dimers, katalysiert die Bildung einer proviralen DNA aus der RNA-Vorlage. Die Endonuklease IN (32 kD) ist für die Integration der Provirus-DNA in Wirtszellchromosome verantwortlich (SPARGER et al., 1989; TALBOTT et al., 1989). Zusätzlich entsteht aus dem Pol-Protein die dUTPase (ELDER et al.,

1992). Die dUTPase ist ein Reparatur-Enzym, das den Einbau von Uracil in DNA verhindern und damit Genom-mutationen vorbeugen soll (INOSHIMA et al., 1998b).

Die durch *env* kodierten Oberflächenproteine SU und TM werden von zellulären Proteasen aus einem glykosylierten Vorläuferprotein geschnitten (EGBERINK et al., 1990; VERSCHOOR et al., 1993). Sie sind für die Bindung und Fusion mit der Wirtszelle von Bedeutung. Untersuchungen von MIYAZAWA und Mitarbeitern (1991) und PANCINO und Mitarbeitern (1993) zufolge, enthält SU fünf variable Regionen (V1 bis V5), wobei die V3-Region mit dem Zellrezeptor interagiert, für den Zelltropismus verantwortlich ist und bei der Bildung neutralisierender Antikörper eine entscheidende Rolle spielt (LOMBARDI et al., 1993; VAHLENKAMP et al., 1999). Das *env*-Gen zeigt eine weitaus höhere Variabilität in seiner Sequenz als die beiden anderen Gene (GREENE et al., 1993; RIGBY et al., 1993). Die Einteilung in die verschiedenen Subtypen des FIV wird aufgrund von Sequenzunterschieden in den Bereichen des *env*-Gens vorgenommen, die für die variablen Regionen des SU kodieren (SODORA et al., 1994).

1.1.2. Weitere Gene

Neben den drei großen ORF, *gag*, *pol* und *env*, enthält das FIV-Genom drei weitere Gensequenzen *vif*, *rev* und ORF A, die regulatorische Proteine kodieren (OLMSTED et al., 1989a; OLMSTED et al., 1989b; TALBOTT et al., 1989; MIYAZAWA et al., 1994). Das *vif*- (viral infectivity factor) Gen schließt direkt an das *pol*-Gen an. TOMONAGA und Mitarbeiter (1992) zeigten, daß es sich in Position, Größe und Funktion nicht von dem *vif*-Gen der Primaten-Lentiviren und dem ORF Q des Visna-Virus (SONIGO et al., 1985) unterscheidet. Die genaue Funktion des Vif-Proteins ist noch nicht bekannt; man geht davon aus, daß es im Spätstadium des Zusammenbaus der Nukleoproteinhülle und im Frühstadium der viralen Replikation notwendig ist (EMERMAN und MALIM, 1998). *Vif*-defekte Virusisolate sind nicht in der Lage, Provirus-DNA in die Wirtszell-DNA zu integrieren (MILLER et al., 2000).

Die beiden das *rev*-Gen bildenden Exons, Bereiche der DNA, die genetische Information enthalten und in mRNA umgeschrieben werden, flankieren das *env*-Gen (PHILLIPS et al., 1992; TOMONAGA et al., 1993). Rev-Regulatorproteine binden im Zellkern vor dem „Splicing“ an einen Bereich der viralen mRNA, das

Rev-Responsive-Element (RRE), und stabilisieren die mRNA dadurch für den Transport ins Zytoplasma (ROSEN et al., 1988; MALIM et al., 1989). Bei geringen Rev-Proteinmengen finden sich hauptsächlich kleinere mRNA-Stücke im Zytoplasma; bei höheren Rev-Konzentrationen wird die RNA als ganzer Strang oder nur einmal gespalten transportiert. Da ganze RNA-Stücke für die Bildung infektiöser Viren notwendig sind, beeinflussen die Rev-Proteine konzentrationsabhängig, ob sich die Infektion in einer latenten oder produktiven Phase befindet (MIYAZAWA et al., 1994).

Die dritte Gensequenz, **ORF A**, liegt zwischen den Sequenzen für *vif* und *env* und entspricht damit in seiner Lage dem *tat*-Gen des HIV (CLEMENTS und ZINK, 1996). Tat-Protein interagiert mit der Tat-Aktivierungsregion (TAR) am 3'-Ende der proviralen DNA. Durch Bindung aktiviert es spezifisch die Transkription der in die Wirtszelle eingeschleusten Gene (HAMY et al., 2000). FIV besitzt keine TAR. Das durch ORF A kodierte Protein aktiviert jedoch ebenfalls die Gen-Expression, indem es vermutlich mit einem speziellen Bereich der Long Terminal Repeats interagiert (THOMPSON et al., 1994; INOSHIMA et al., 1998a).

MIYAZAWA und Mitarbeiter fanden 1993 bei einem FIV-Stamm eine, dem *nef*-Gen des HIV entsprechende Gensequenz, deren Einfluss auf die Virusvermehrung unklar ist. Das Nef-Protein des HIV hat mehrere Effekte, wobei der Einschleusung und Deaktivierung (Down-Regulation) von CD4- (cluster of designation) und MHC-Klasse-I- (major histocompatibility complex) Oberflächenrezeptoren in der Wirtszellmembran eine wichtige Rolle zukommt. Die Reduktion der Anzahl an CD4-Molekülen auf der Oberfläche erleichtert während der Knospung („Budding“) von Tochterviren die Expression von Env-Proteinen (AIKEN et al., 1994; GARCIA et al., 1993) und verhindert die Superinfektion einer Zelle (BENSON et al., 1993).

Long Terminal Repeats (LTR) begrenzen beiderseits das provirale Genom (ELDER und PHILLIPS, 1993) und umfassen die Domänen U3, R und U5 (ELDER und PHILLIPS, 1995). Die LTR sind für die Integration der proviralen DNA in Wirtszellchromosome verantwortlich und kontrollieren die virale DNA- und RNA-Synthese (OLMSTED et al., 1989b; SHERMAN et al., 1989). Die U3-Region enthält die Enhancer-/Promotor-Bindungsstellen AP-1, AP-4, ATF, LBP1, CCAAT- und TATA-Box, die das Ablesen von Genen verstärken und fördern (TALBOTT et al., 1989; MIYAZAWA et al., 1993). Die R-Region beinhaltet das

Poly-A-Signal, das Signal für den Endpunkt der Polymerisation (MIYAZAWA et al., 1994).

1.2. Viraler Replikationszyklus

Retroviren sind in der Lage, ihr Genom als Provirus in ein Wirtszellchromosom zu integrieren und damit dessen Erbinformation permanent zu verändern (CLEMENTS und PAYNE, 1994; CLEMENTS und ZINK, 1996; TANG et al., 1999). Dazu muss das Virus in die Zelle gelangen, dort die eigene Erbinformation freisetzen, die einsträngige RNA in eine doppelsträngige DNA umschreiben und diese in ein Chromosom der Wirtszelle integrieren (VINK et al., 1994). Anschließend muss die infizierte Zelle virale Proteine produzieren und das virale Genom replizieren, damit neue, infektiöse Viruspartikel entstehen können (Abb. 2).

1.2.1. Viruseintritt in die Zelle

Im ersten Schritt bindet das FIV mit seinen Hüllprojektionen an Rezeptoren auf der Oberfläche empfänglicher Zellen (EARL et al., 1990b; LOMBARDI et al., 1995). Während das Transmembranprotein TM, dessen Aminoende das Fusionspeptid darstellt, mit seinem Carboxyende in der Virushülle verankert ist, liegt das, die Rezeptorbindungsstelle tragende Oberflächenprotein SU vollständig außerhalb der Membran (CLEMENTS und PAYNE, 1994; FLINT et al., 2000). VERSCHOOR und Mitarbeiter (1993) zeigten, daß die V3-Domäne des SU-Proteins bei der Adsorption eine entscheidende Rolle spielt. Die Interaktion von SU mit dem Oberflächenrezeptor der Zelle induziert eine Konformationsänderung an TM, durch die das hydrophobe Fusionspeptid in die Zellmembran eingebettet und die Verschmelzung der Virushülle vermittelt wird (GILBERT et al., 1995; CHAN und KIM, 1998). HIV benötigt für diesen Vorgang meist zwei Rezeptoren, das CD4-Molekül und einen Korezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren. Es wurden aber auch Virusisolate beschrieben, die eine Zelle CD4-unabhängig infizieren können (ENDRES et al., 1996; DUMONCEAUX et al., 1998; HOFFMAN et al., 1999). Die Wahl des Korezeptors hängt von den variablen Regionen in der V3-Domäne des gp120 ab (GALLO und LUSSO, 1997). Es wird zwischen R5- und X4-Stämmen unterschieden, die hauptsächlich CCR5 bzw. CXCR4 als Korezeptor nutzen. FIV kann den Chemokinrezeptor CXCR4 ohne zweiten Rezeptor zur Bindung nutzen (RUCKER et al., 1997; POESCHLA und

LOONEY, 1998; FREY et al., 2001). Nach der Fusion wird das Kapsid intrazellulär freigesetzt (Uncoating).

1.2.2. Reverse Transkription und Integration

Nachdem das Viruskapsid ins Zytoplasma der Zelle gelangt ist, werden die beiden RNA-Stränge aus dem Innenkörper entlassen. Bei HIV ist die Anwesenheit und der Einbau von zellulärem Cyclophyllin A (CyPA) in die Hülle des Innenkörpers notwendig, damit diese sich in der neu infizierten Zelle öffnen und das Genom entlassen kann (BRAATEN et al., 1996; LUBAN, 1996). Anschließend wird die Einzelstrang-RNA von der RT in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die reverse Transkription läuft in mehreren Schritten ab. Sie beginnt am 5'-Ende der RNA mit einem tRNA-Primer, der schon im infizierenden Virion an die RNA-Sequenz primer-binding-site (pbs), gebunden ist, an der die Transkription beginnen soll (COFFIN, 1996). Nach einer Verlängerung um ca. 100 Nukleotide endet die Synthese des (-)DNA-Stranges und die als Vorlage genutzte RNA wird durch die Aktivität der Ribonuklease H (RNaseH) abgespalten (TOPPING et al., 1998). Dieses kurze Transkriptionsprodukt dient als Anfang für die weitere (-)DNA-Synthese, indem es an das 3'-Ende des gleichen oder des anderen RNA-Stranges bindet. Wie KATZ und SKALKA (1994) zeigten, wird die komplementäre (-)DNA durch Kopie der RNA gebildet und dann als Vorlage für den (+)DNA-Strang genutzt. Als Produkt entsteht ein doppelsträngiges, lineares DNA-Molekül, das an beiden Enden von identischen LTRs flankiert wird. Im Gegensatz zu anderen Retroviren, die eine Teilung der Wirtszelle benötigen, um ihr Genom in den Zellkern zu transferieren, wird die DNA von Lentiviren aktiv während der Interphase in das Kernkompartiment importiert (Translokation) (BUKRINSKY et al., 1992; LEWIS und EMERMAN, 1994; LODGE et al., 1998). Für die Translokation bildet sich ein Prä-Integrations-Komplex (PIC) aus dicht gepackter, ringförmiger viraler DNA und einigen viralen Proteinen, darunter die RT, das MA und die IN (BUKRINSKY et al., 1992; WHITWAM et al., 2001). Die Effektivität des Transports wird durch eine DNA-Tasche („central DNA flap“), in deren Bereich die DNA einzelsträngig vorliegt, beeinflusst (WHITWAM et al., 2001). Der Einbau des viralen Genoms in Chromosome der Wirtszelle geschieht willkürlich (WITHERS-WARD et al., 1994; AIYAR et al., 1996), es wird jedoch vermutet, dass Stellen bevorzugt werden, die aufgelockert oder partiell entwunden sind (HEUER und BROWN, 1998). Unerlässlich für die

Integration sind die LTR, die zunächst an beiden Enden um 2 bp verkürzt und deren 3'-Enden dann mit Zielsequenzen im Wirtschromosom verbunden werden (TANG et al., 1999). Das integrierte Provirus persistiert im Wirtszellgenom und wird bei Zellteilung an die Tochterzellen vererbt.

1.2.3. Transkription und Translation

Eine wichtige Eigenschaft der Lentiviren ist ihre Fähigkeit, sich in ausdifferenzierten, sich nicht teilenden Zellen zu vermehren (ZACK et al., 1990; ZACK et al., 1992; CLEMENTS und PAYNE, 1994). Die U3-Region der LTR enthält Enhancer- und Promotor-Sequenzen, die mit zellulären Transkriptionsfaktoren interagieren (LEVY, 1993; CLEMENTS und PAYNE, 1994; CLEMENTS und ZINK, 1996). Die Transkription viraler Gene wird durch die Bindung dieser Faktoren gesteuert. Bei FIV binden die zellulären Proteine AP-1 und AP-4 an Zielsequenzen im U3-Bereich, wodurch die Transkription in virale mRNA initiiert wird.

Die Genexpression bei Lentiviren ist charakterisiert durch eine frühe und eine späte Phase. In der frühen Phase verlassen nur kurze, vollständig geschnittene mRNA-Stücke, die für die regulatorischen Proteine Tat, Rev, im Falle von HIV auch Nef kodieren, den Zellkern (CLEMENTS und PAYNE, 1994). Die Interaktion des Tat-Proteins stabilisiert den Transkriptionskomplex und fördert die virale Genexpression und Verlängerung der mRNA (CULLEN, 1992; CLEMENTS und PAYNE, 1994; TANG et al., 1999). Der Übergang von der frühen in die späte Phase wird durch die Konzentration an Rev-Protein bestimmt (CLEMENTS und ZINK, 1996). Rev bindet an virale mRNA, wodurch bei hohen Rev-Konzentrationen das ‚Splicing‘ umgangen und ungeschnittene oder nur einmal geschnittene mRNA ins Zytoplasma transportiert wird (TANG et al., 1999). Weiterhin vermittelt Rev die Bindung dieser mRNA an zelluläre Polyribosomen (CLEMENTS und ZINK, 1996), an denen dann die Strukturproteine Gag und die enzymatischen Pol-Proteine, die für den Zusammenbau des Viruspartikel benötigt werden, entstehen. Für die Bildung des Env-Proteins ist einmalig geschnittene mRNA notwendig, die ebenfalls Rev-abhängig ist (CLEMENTS und ZINK, 1996).

1.2.4. Zusammenbau und Knospung

Um ein infektiöses Virus aus der Zelle zu entlassen, müssen alle Komponenten an der Zellmembran zusammengefügt werden. Die Env-Vorläuferproteine werden am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und danach glykosyliert. Schließlich werden TM und SU durch Disulfidbrücken verbunden (FLINT et al., 2000). Am Golgi-Apparat entstehen mehrere Oberflächenproteine, die in Bereiche der Zellmembran eingelagert werden, die eine hohe Konzentration an Cholesterol, Sphingolipiden und Glykolipiden enthalten (LIAO et al., 2001). Die Translation der Gag- und Pol-Vorläuferproteine geschieht an zytoplasmatischen Ribosomen (FLINT et al., 2000). Gag wird im Bereich, der später zu MA gespalten wird, myristyliert, d. h. an Myristylinsäure gebunden (ELDER und PHILLIPS, 1993) und dann an die intrazelluläre Domäne von TM angelagert. Durch die Bindung des viralen RNA-Dimers an das NC wird der Zusammenbau des Virus initiiert. Eines von zehn auf diese Weise an die Zellmembran gebundenen Gag-Polyproteine trägt am Carboxyende die Translationsprodukte der viralen Enzyme PR, RT und IN (MORIKAWA und BISHOP, 1992).

Die Größe des entstehenden Virus wird durch Interaktionen zwischen den Gag-Proteinen bestimmt. Es bildet sich eine halbmondförmige Erhebung der Zellmembran, die im weiteren Verlauf eine geschlossene Hülle um das Virus bildet und es dann in den Interzellularraum entlässt (PARENT et al., 1995). Durch die proteolytische Aktivität der viralen Protease werden die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine gespalten. Ein reifes, infektiöses Virus mit dem fertigen Innenkörper entsteht (FLINT et al., 2000).

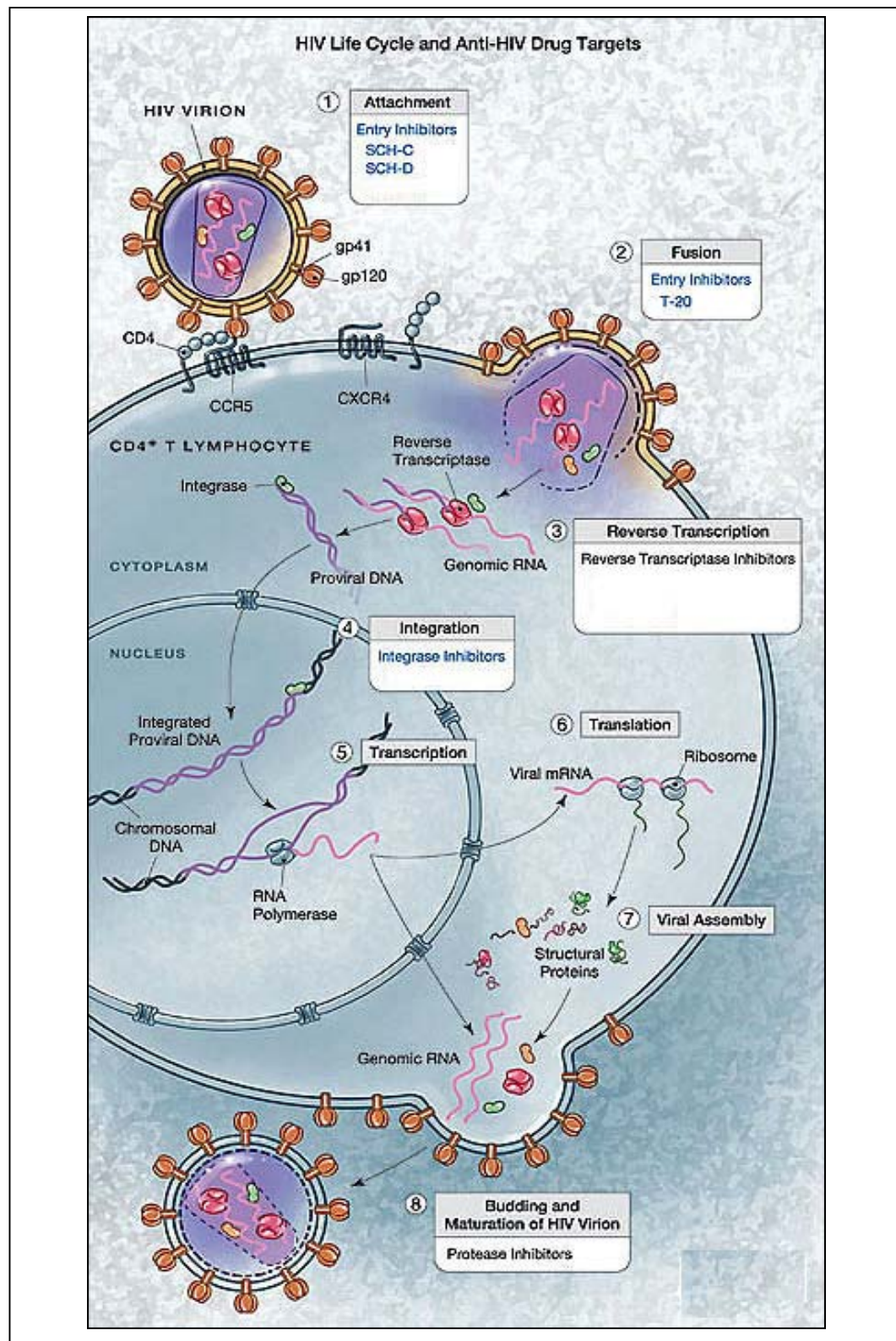


Abb. 2: Replikationszyklus von HIV und Hemmstoffe der Virus-Vermehrung in den verschiedenen Abschnitten der Virusvermehrung
(www.jama.ama-assn.org/issues/v287n13/images/jmn20027f1.jpg)

2. Rezeptoren

Der erste Schritt im viralen Infektionszyklus ist der Eintritt des Virus in die Wirtszelle. Er wird durch Interaktionen von Zelloberflächenrezeptoren mit der Virushülle vermittelt (EARL et al., 1990a; LOMBARDI et al., 1995; CAMMACK, 1999). Diese Interaktionen lösen Konformationsänderungen im TM aus. Dadurch wird an dessen Aminoende ein lipophiles Fusionspeptid freigelegt und die Fusion der Virus- und der Zellmembran eingeleitet (VAHLENKAMP et al., 1997; SALZWEDEL und BERGER, 2000). HIV benötigt für die Fusion mit der Wirtszelle zwei Rezeptoren, den CD4-Rezeptor (NOVOTNEY et al., 1990; ROBEY und AXEL, 1990; DUMONT DRIEUX et al., 1992) und einen Korezeptor (DIMITROV, 1996, 1997; GALLO und LUSSO, 1997; BERGER et al., 1999a; CAMMACK, 1999). Als Korezeptoren für HIV dienen Oberflächenproteine aus der Familie der Chemokinrezeptoren (ALKHATIB et al., 1996; DENG et al., 1996; FENG et al., 1996; DORANZ et al., 1997). FIV infiziert die Zielzellen unabhängig von CD4 (BROWN et al., 1991; WILLETT et al., 1991; DUMONT DRIEUX et al., 1992; HOSIE et al., 1993; NORIMINE et al., 1993; ALKHATIB et al., 1996; DENG et al., 1996; FENG et al., 1996; DORANZ et al., 1997), nach dem heutigen Wissensstand allein über einen Chemokinrezeptor (WILLETT et al., 1997b; POESCHLA und LOONEY, 1998).

2.1. Chemokine und Rezeptoren

Chemokin-Rezeptoren und ihre Liganden die Chemokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Reifung des Immunsystems und bei der Kontrolle der zellulären und humoralen Immunität.

2.1.1. Chemokine

Der Ausdruck Chemokin steht für „chemotaktisches Zytokin“. Zytokine sind hormonähnliche Proteine. Sie werden von verschiedenen Zellen sezerniert und beeinflussen Zellen über Oberflächen-Rezeptoren (Zytokinrezeptor), die spezifisch ihre stimulierende Wirkung erkennen (FELSBURG, 1994). Dabei kann die Zielzelle die gleiche Zelle (autokrin) (MCMANUS et al., 2000), eine Nachbarzelle (parakrin) (NANKI et al., 2001) oder eine weit entfernte Zelle sein (endokrin) (MOHLE et al., 2001), die *via* ins Blut abgegebene Zytokine aktiviert wurde.

Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine, die von Leukozyten freigesetzt werden und deren Bewegungen regulieren (BAGGIOLINI, 1998; SALLUSTO et al., 1999b; LOETSCHER et al., 2000; GERARD und ROLLINS, 2001). Sie haben chemotaktische Aktivität (BAGGIOLINI et al., 1994; VICENTE et al., 1998), d. h. sie signalisieren der angesprochenen Zelle, ob sie sich im Rahmen der Immunantwort zu der Stelle hin oder weg bewegen soll, an der die Chemokine freigesetzt werden (LIN et al., 1998). In Bezug auf ihre Leukozytenspezifität können sowohl Breit- als auch spezifischere Schmalspektrum-Chemokine identifiziert werden. Derzeit sind mehr als 50 verschiedene humane Chemokine identifiziert. Zusammen bilden sie eine Gruppe von interzellulären „messenger“-Molekülen, die entzündliche Prozesse und Immunreaktionen vermitteln (LUSSO, 2000).

2.1.1.1. Struktur

Chemokine sind kleine, sekretorische, positiv geladene Proteine (BAGGIOLINI, 2001). Sie bestehen aus 70 bis 130 Aminosäuren mit zumeist vier konservierten Cysteinen (BAGGIOLINI et al., 1994, 1997). Cystein ist eine ungeladene Aminosäure mit einer Sulfhydrylseitenkette (SH), die sehr reaktiv ist und leicht mit anderen SH-Gruppen Disulfidbindungen eingeht (NASSAL et al., 1992). Als sekretorische Proteine werden Chemokine mit einer Führungssequenz synthetisiert, die vor der Ausschleusung aus der Zelle abgespalten wird (BAGGIOLINI, 2001). Natürlich vorkommende, funktionelle Chemokine wirken, mit wenigen Ausnahmen (BLANPAIN et al., 1999), an ihren Rezeptoren als Agonisten.

Die zwei Chemokin-Hauptfamilien, CXC und CC (auch α - bzw. β -Chemokine genannt), werden durch die Position ihrer ersten beiden Cysteine unterschieden, die entweder durch eine Aminosäuren getrennt sind (CXC) oder direkt aufeinander folgen (CC) (BAGGIOLINI et al., 1995). Die Cysteine bilden untereinander Disulfidbrücken (Cys1 mit Cys3 und Cys2 mit Cys4), die den Chemokinen ihre charakteristische dreidimensionale Struktur verleihen. CXC-Chemokine können noch weiter in zwei funktionell unterschiedliche Strukturgruppen unterteilt werden, je nach Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein der Tripeptidfolge Glutamat-Leucin-Arginin (ERL) am N-terminalen Ende vor dem ersten Cystein (MURPHY et al., 2000). ERL⁺-CXC-Chemokine sind spezifisch für neutrophile Granulozyten (BAGGIOLINI et al.,

1995), während ERL⁻-CXC-Chemokine aktivierte T-Lymphozyten beeinflussen (LIAO et al., 1995).

CXC- und CC-Chemokine tragen zwei Strukturen, durch die sie mit ihren Rezeptoren interagieren, eine am amino-terminalen Ende und eine in der außen liegenden, starren Schleife, die direkt auf das zweite Cystein folgt (LIWANG et al., 1999). Beide werden durch Disulfidbindungen in enger Nachbarschaft gehalten und beeinflussen die Rezeptorerkennung und biologische Aktivität (BAGGIOLINI, 2001). Der Rezeptor interagiert zunächst mit Bindungsstellen innerhalb der Schleifenregion, die als „docking“-Domäne fungiert. Durch diese Bindung wird die Mobilität des Chemokins eingeschränkt und die richtige Ausrichtung der amino-terminalen „triggering“-Domäne gefördert, die den Rezeptor aktiviert (CRUMP et al., 1997). In Geweben binden die Chemokine mit ihren basischen Aminosäuren meist an saure Makromoleküle (Glykosaminoglykane) auf der Zelloberfläche (BAGGIOLINI, 1997; AMARA et al., 1999).

Zusätzlich zu den CC- und CXC-Chemokinen existieren zwei weitere Varianten des Chemokin-Strukturmusters, erstens Lymphotaktin α und β , C-Chemokine mit nur zwei Cysteinen, die dem zweiten und vierten der anderen Gruppen entsprechen (KELNER et al., 1994), und zweitens Fraktalkin, bei dem zwischen den ersten zwei Cysteinen drei Aminosäuren liegen (CX3C) (COMBADIÈRE et al., 1998). Fraktalkin besteht aus verschiedenen Elementen, der Chemokindomäne verbunden mit einem Mukopolysaccharidprotein-ähnlichen Stiel und einem Transmembrananteil, der das Molekül in der Zellmembran verankert, das wiederum an eine zytoplasmatischen Domäne gebunden ist. Dementsprechend funktioniert es als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, indem es direkt an seinen Rezeptor (CX3CR1) bindet (IMAI et al., 1997b). Die anderen Chemokine besitzen keine Transmembrandomäne, sind aber trotzdem in der Lage, zelluläre Glykosaminoglykane für die Anheftung an die Endothelzellmembran zu verwenden (SPRINGER, 1995).

Die Gene für entzündungsfördernde Chemokine finden sich typischerweise auf den humanen Chromosomen 4 (CXC) und 17 (CC). Die für die hämostatischen sind alleine oder in kleinen Verbänden auf den Chromosomen 1, 2, 5, 7, 9, 10 und 16 lokalisiert sind (MURPHY et al., 2000).

2.1.1.2. Funktion

Chemokine haben Einfluss auf die Organentwicklung und die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Immunität. Dabei können einerseits auf einer Zelle verschiedene Chemokine an einen Rezeptor (ZHANG et al., 1999) und andererseits unterschiedliche Rezeptoren dasselbe Chemokin binden (MOROHASHI et al., 1995). Durch diese Überlappung von Chemokinrezeptor-Bindungsmöglichkeiten entstehen funktionelle Einheiten, die für die jeweilige Leukozyten-Untergruppe spezifisch sind (BAGGIOLINI, 1998).

Chemokine locken selektiv unreife Vorläuferzellen und reife, immunkompetente Zellen in spezifische Gewebe („homing“-Funktion), sie induzieren und verstärken die Funktionen der Immunzellen (Effektor- oder Entzündungs-Funktion) und beeinflussen das Sekretionsmuster von Zytokinen während einer Immunreaktion (Polarisations-Funktion) (LUSSO, 2000).

Über die „homing“-Funktion vermitteln sie die Anheftung der Leukozyten an Endothelien und die Wanderung aus den Gefäßen (BAGGIOLINI et al., 1994). Sie geben, in Kombination mit anderen Zytokinen, den Leukozyten die richtige „Adresse“ an (SPRINGER, 1994). „Homing“-Chemokine werden in einigen Geweben ständig exprimiert und induzieren die Einwanderung gewebsspezifischer Leukozyten (BAGGIOLINI und LOETSCHER, 2000). Die „homing“-Funktion spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Homöostase des hämatopoetischen Systems (PSENAK, 2001), in der Kontrolle der Angiogenese (FEIL und AUGUSTIN, 1998; GUPTA et al., 1998a) und in der Regulation des Nervenzellwachstums (HESSELGESSER et al., 1997; BERGER et al., 1999b).

Entzündungs-Chemokine locken Immunzellen, wie Granulozyten, T-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten und unreife dendritische Zellen an den Ort der Entzündung oder bakteriellen Invasion (GAO et al., 1997; YOUSEFI et al., 2001). TANAKA und Mitarbeiter (1993) zeigten, dass Chemokine die Anheftung von Leukozyten an das Gefäßendothel vermitteln. Dadurch wird deren Wanderung in Gewebe, in denen das Antigen lokalisiert ist, gefördert (CAMPBELL et al., 1998).

2.1.2. Chemokinrezeptoren

Die Expression der Rezeptoren auf den Zielzellen ist für die Funktion des Chemokinsystems ebenso wichtig wie die Sekretion der Chemokine. Chemokinrezeptoren sind Rezeptoren, die nach Bindung eines oder mehrerer

Chemokine, ein Signal übertragen können (BAGGIOLINI et al., 1997; YOSHIE et al., 1997; LUSTER, 1998; ZLOTNIK et al., 1999). Derzeit sind 18 humane Rezeptoren bekannt, die diese Funktion erfüllen. Sie wurden als CXCR1 bis CXCR6, CCR1 bis CCR10, XCR1 und CX3CR1 gekennzeichnet, basierend auf ihren jeweiligen Chemokinpräferenzen (ZLOTNIK und YOSHIE, 2000). Die Chemokinrezeptoren gehören zur großen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Oberflächenrezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembrandomänen (7-TMD) (BAGGIOLINI et al., 1997). Das „R“ steht dabei für das Wort „Rezeptor“, daher ist die Bezeichnung „CXCR4-Rezeptor“ überflüssig, wird aber häufig gebraucht. Zusätzlich existieren D6 und Duffy, zwei chemokinbindende Rezeptoren mit 7-TMD, die aber kein Signal übertragen und daher aus der systemischen Nomenklatur ausgeschlossen wurden (AHUJA et al., 1994; NIBBS et al., 1997b). Chemokinrezeptor-ähnliche Sequenzen wurden bei Säugetieren, Vögeln (GUPTA et al., 1998b) und Fischen (DANIELS et al., 1999) identifiziert, nicht aber bei Invertebraten, Pflanzen, Hefen oder Bakterien. Die Aminosäuresequenz aller Chemokinrezeptoren zeigte 25 bis 80 % Übereinstimmung untereinander, daher wird ein gemeinsamer Ursprung vermutet (MURPHY et al., 2000). Die Rezeptoren haben eine Länge von 340 bis 370 Aminosäuren, ein saures N-terminales Ende, eine kurze basische intrazelluläre Schleife und ein Cystein in jeder der vier extrazellulären Domänen (BRODER und COLLMAN, 1997). Basierend auf der Spezifität für ihre Liganden können die Chemokinrezeptoren in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden, erstens spezifische, nur einen einzigen Liganden bindende, zweitens mehrere Liganden einer Chemokinfamilie bindende und drittens unselektive, Chemokine verschiedener Familien bindende Chemokinrezeptoren (PREMACK und SCHALL, 1996).

Die Expression auf der Zelloberfläche der Immunzellen wechselt im Laufe der Reifung. So werden auf unreifen T-Lymphozyten zunächst konstitutionelle Rezeptoren und nach Aktivierung Entzündungs-Chemokine (SALLUSTO et al., 1998b; SALLUSTO et al., 1999a; SOZZANI et al., 1999b) exprimiert, während dies bei antigenpräsentierenden Zellen umgekehrt ist (SALLUSTO et al., 1998b; SOZZANI et al., 1999b). In Analogie zu den Chemokinen werden auch die Rezeptoren in konstitutionelle, (homöostatische, „homing“ oder housekeeping-Rezeptoren), und induzierbare (Entzündungsreaktionen-vermittelnde) eingeteilt (LUSSO, 2000). Homöostatische Rezeptoren sind CXCR4, CXCR5, CCR4,

CCR7 und CCR9. Zu den induzierbaren Entzündungsrezeptoren zählen CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 und CCR6.

Die Signalübertragung erfolgt über ein Pertussis-toxin-sensitives G-Protein (G_i -Protein) (ALFANO et al., 1999), ein Protein, das durch *Bordetella-pertussis*-Toxin gehemmt wird. Nach NARDELLI und Mitarbeitern (1999) führt die Aktivierung des G_i -Proteins über eine Kette von Enzyminduktionen zum Einstrom sowohl extrazellulären, als auch intrazellulär gespeicherten Kalziums ins Zytoplasma. Die Ligandenbindung der Chemokinrezeptoren ist sehr komplex und involviert mehrere Domänen. Mindestens zwei Bindungsstellen sind notwendig, eine für das Anheften und die zweite für die Signalübermittlung (AHUJA et al., 1996; CRUMP et al., 1997). Durch die kontrollierte Expression von Chemokinenrezeptoren und ihren Liganden wird die Wanderung der Leukozyten bei allen Immunantworten (SPRINGER, 1994; FOXMAN et al., 1997) und Entzündungen (OCHI et al., 1999; SCHWARZ und MURPHY, 2001) koordiniert. Innerhalb dieser generellen Funktionen hat jeder Chemokinrezeptor eine spezielle Aufgabe, festgelegt durch dessen Expressionsmuster auf verschiedenen Leukozytenuntergruppen und durch die zeitliche und räumliche Expression der spezifischen Chemokine (BAGGIOLINI und LOETSCHER, 2000). Lebenswichtige Funktionen wurden bei der Hämatopoese (ZOU et al., 1998; BROXMEYER und KIM, 1999), der Angiogenese (SALCEDO et al., 1999) und der Entwicklung vieler Organe (TACHIBANA et al., 1998; ZOU et al., 1998; ROSSI und ZLOTNIK, 2000; HAN et al., 2001) nachgewiesen. Entgegen der physiologischen Bestimmung helfen die Chemokinrezeptoren verschiedene Virusinfektionen zu vermitteln (MURPHY, 1994; LALANI et al., 1999; LINENBERGER und DENG, 1999; IGNATIUS et al., 2000). Dabei werden zelluläre Chemokinrezeptoren als Zelleintrittspforte missbraucht (BERGER et al., 1999a; LOCATI und MURPHY, 1999) oder viruskodierte Chemokine oder Chemokinrezeptoren exprimiert, wodurch die Immunantwort gestört oder das Zellwachstum dysreguliert wird (PEASE und MURPHY, 1998). Die für die HIV- und FIV-Infektion wichtigen Chemokinrezeptoren sind CCR5 und CXCR4 (Abb. 3).

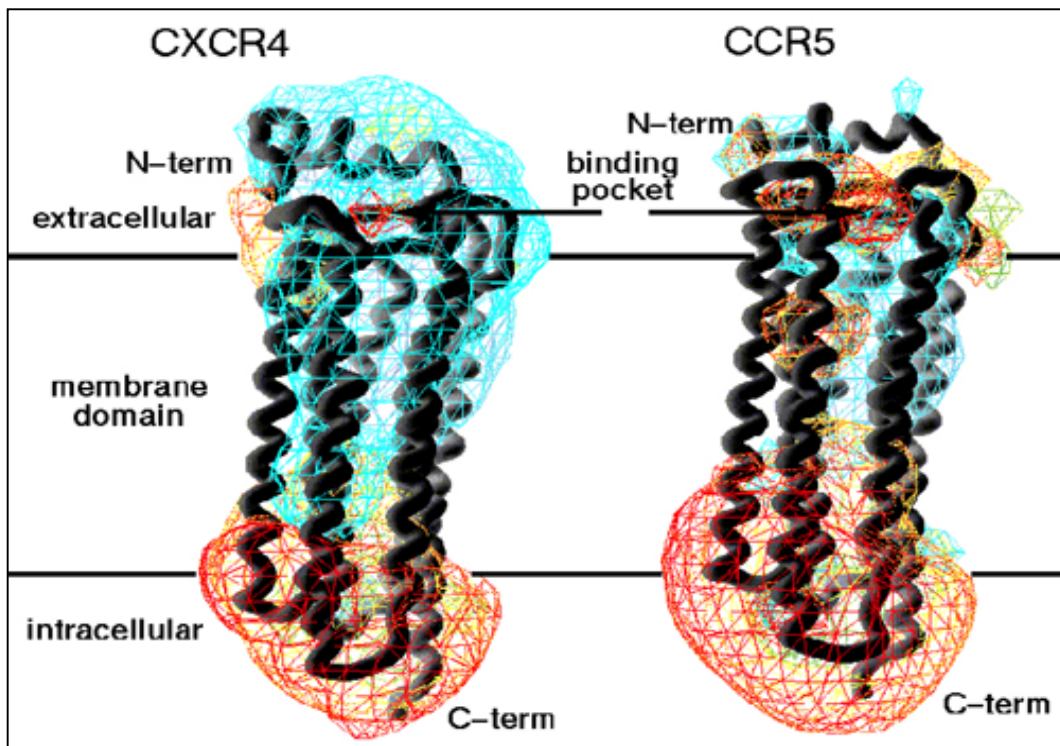


Abb. 3: Dreidimensionale Darstellung der beiden, für die HIV-Infektion bedeutsamen Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5

(www.usuhs.mil/mic/CXCR4-CCR5.jpg, modifiziert)

2.1.2.1. CXC-Rezeptoren

Aus der Familie der CXC-Rezeptoren sind CXCR4, CXCR5 und CXCR6 bei der Vermittlung der HIV- oder FIV- Infektion von Bedeutung. Die anderen werden nur kurz besprochen.

CXCR1 und CXCR2 zeigen ähnliche Eigenschaften. Beide binden nur ERL⁺-CXC-Chemokine, hauptsächlich IL-8. Auf neutrophilen Granulozyten sind sie die vorherrschenden Chemokinrezeptoren und die Hauptrezeptoren für entzündliche, induzierbare Chemokine (MURPHY, 1997; BRUHL et al., 2001), die vornehmlich bei akuten Entzündungsreaktionen von Bedeutung sind. Zusätzlich zu neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen werden CXCR1 und CXCR2 auch auf aktivierten eosinophilen (NAGASE et al., 2001) und basophilen Granulozyten (IIKURA et al., 2001), T-Lymphozyten (SALLUSTO et al., 1998b), Mastzellen (NILSSON et al., 1999), dendritischen Zellen (SOZZANI et al., 1997) und auf Zellen des zentralen Nervensystems (XIA und HYMAN, 1999) exprimiert (Abb. 5 und 6).

CXCR3 ist ein entzündlich-induzierbarer Chemokinrezeptor, der in großen Mengen auf aktivierten T-Zellen (RABIN et al., 1999), B-Zellen und natürlichen

Killer-Zellen (NK) (LOETSCHER et al., 1998a; QIN et al., 1998) exprimiert wird. Er bindet die drei entzündlichen ERL⁻-CXC-Chemokine I-Tag, MIG und IP-10 (COLE et al., 1998; LOETSCHER et al., 1998a; WENG et al., 1998). CXCR3 wird häufiger auf Th1-Zellen als auf Th2-Zellen nachgewiesen (NANKI und LIPSKY, 2000), kann aber nicht als selektiver Marker zu deren Unterscheidung genutzt werden (ANNUNZIATO et al., 1999) (Abb. 6).

2.1.2.1.1. CXCR4

Ursprünglich als erster Chemokinrezeptor für T-trope HIV-Stämme identifiziert und mit dem Namen „Fusin“ belegt (FENG et al., 1996) wurde er in CXCR4 umbenannt, nachdem der natürliche Ligand stromal cell-derived factor (SDF-1), ein CXC-Chemokin, gefunden war (BLEUL et al., 1996; OBERLIN et al., 1996). CXCR4 ist 352 Aminosäuren lang (Abb. 4). Es existiert eine Variante, die durch Spaltung des Vorläuferproteins an einer anderen Stelle entsteht und die Länge des N-terminalen Endes beeinflusst, jedoch nicht die Affinität für den Liganden (HEESEN et al., 1997; FRODL et al., 1998). Sein Ligand SDF-1 kann durch alternatives Splicing ebenfalls in zwei Formen vorliegen, SDF-1 α und β . Das C-Ende von SDF-1 β ist 4 Aminosäuren länger als das von SDF-1 α (SHIROZU et al., 1995). Beide unterscheiden sich nicht in ihrer Funktion. Sie sind die einzigen natürlichen Agonisten für CXCR4 und ihre Bindung induziert Kalziumeinstrom und Chemotaxis (DUTT et al., 1998; VICENTE et al., 1998). CXCR4 wird auf fast allen Zellen des hämatopoetischen Systems (TACHIBANA et al., 1998), auf unreifen und aktivierten T- und B-Zellen und deren Knochenmarksvorstufen (BLEUL et al., 1997), Monozyten (ANANWORANICH et al., 2000) Makrophagen (YI et al., 1998) und auf Thymuszellen (ZAITSEVA et al., 1998) exprimiert (Abb. 5 und 6). Ebenso findet sich CXCR4 in hohen Konzentrationen auf Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems (LAVI et al., 1997) und auf Endothelzellen (GUPTA et al., 1998a).

ZOU und Mitarbeiter (1998) wiesen nach, daß Mäuse, denen CXCR4 fehlt, hämatopoetische und kardiale Defekte aufweisen. Die Tiere wurden entweder tot oder lebensschwach geboren. Identische Defekte wurden bei SDF-1-defizienten Mäusen nachgewiesen (NAGASAWA et al., 1996). CXCR4 scheint auch eine Rolle bei der Metastasierung von Brustkrebs zu spielen. Er wurde in hohem Konzentrationen auf humanen Brustkrebs-Zelllinien und -Tumorgewebe nachgewiesen (MULLER et al., 2001). SDF-1 wird in der Lunge, Leber und im

Knochenmark produziert, Gewebe, in denen häufig Brustkrebsmetastasen gefunden werden (MOORE, 2001).

CXCR4 ist einer der beiden Haupt-Korezeptoren für die HIV-Infektion, er wird von T-tropen, synzytienbildenden HIV-Isolaten verwendet (BERGER et al., 1999a), die mit der Progression zu AIDS verbunden sind (CHEN et al., 1997; BERGER et al., 1999a; GRIVEL et al., 2001). HIV-Stämme, die CXCR4 verwenden, werden als X4-Stämme bezeichnet. Eine Verzögerung der Progression zu AIDS zeigen HIV-Infizierte, die eine Mutation in einem Allel des *sdf-1*-Gens aufweisen (ALVAREZ et al., 1999). Für CXCR4 konnte bisher keine Genmutation oder posttranslationale Modifikation gefunden werden, die eine reduzierte HIV-Affinität bedingen würde (COHEN et al., 1998; FARZAN et al., 2002). Wahrscheinlich hätte eine Gen-Mutation von CXCR4, die zu nicht funktionsfähigen Rezeptoren führen würde, eine letale Auswirkung auf deren Träger und würde daher ausgesiebt.

FIV nutzt CXCR4 als Rezeptor für den Eintritt in die Wirtszelle (RICHARDSON et al., 1999). Dabei fungiert CXCR4 als Haupt-Rezeptor, FIV kann unabhängig von CD4 in die Zelle eindringen (FREY et al., 2001).

2.1.2.1.2. CXCR5

CXCR5 wird auf B-Lymphozyten exprimiert (LEGLER et al., 1998; BRANDES et al., 2000) und häufig auf Zellen von B-Zelllymphomen nachgewiesen (DURIG et al., 2001). Der einzige natürliche Agonist ist das „B cell attracting chemokine 1“ (BCA-1), ein homing-Chemokin, das in hohen Konzentrationen in sekundären Lymphorganen, wie z. B. Lymphknoten und Organ-assoziierten Lymphgeweben, exprimiert wird (GUNN et al., 1998). Auf T-Zellen wird CXCR5 nach Aktivierung exprimiert. Dies ist für ihre Wanderung zu B-Zell-Follikeln während einer zellvermittelten Immunantwort von entscheidender Bedeutung (ANSEL et al., 1999). Es gibt bisher keinen eindeutigen Beweis, dass FIV auch CXCR5 als Rezeptor für den Eintritt in die Zellen nutzen kann.

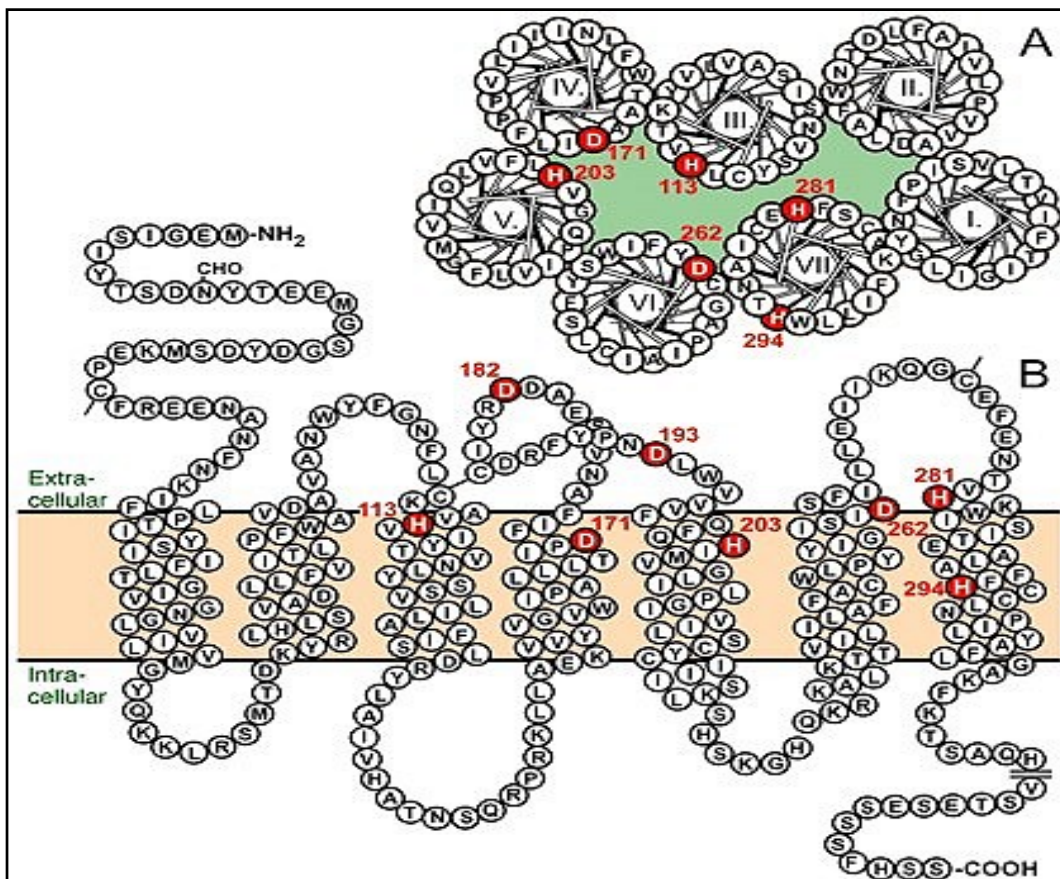


Abb. 4: Darstellung von Struktur und Aminosäurefolge des CXCR4 in Aufsicht und im Querschnitt. Die rot unterlegten Aminosäuren D171 und D262 entsprechen den für die AMD3100-Bindung unerlässlichen Aspartat-AS (aus GERLACH et al., 2001)

Mäuse mit defekten *cxcr5*-Genen zeigen schwere Störungen der normalen B-Zell-Wanderung, sie haben keine inguinalen Lymphknoten, wenige Peyersche Platten, abnorme primäre Lymphfollikel, und die Keimzentren in der Milz sind nicht funktionsfähig (FORSTER et al., 1996). HIV-2, aber nicht HIV-1, kann CXCR5 als Korezeptor für den CD4-abhängigen Eintritt in die Wirtszelle nutzen. BCA-1 und monoklonale Antikörper gegen CXCR5 bewirkten *in vitro* eine Hemmung der HIV-2-Infektion in CD4⁺/CXCR5⁺-Zellen (KANBE et al., 1999).

2.1.2.1.3. CXCR6

CXCR6 ist der ursprünglich als BONZO/STRL33 (LIAO et al., 1997) oder TYMSTR (LOETSCHER et al., 1997) bezeichnete Chemokinrezeptor. Er bindet selektiv CXCL16, ein membrangebundenes Chemokin, dessen Konformation dem Fraktalkin ähnelt (WILBANKS et al., 2001; NAKAYAMA et al., 2003). CXCR6 wird von B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (MATLOUBIAN et

al., 2000) sowie von T-Gedächtniszellen und einigen Untergruppen aktivierter Th1-Zellen und zytotoxischer Typ1-T-Zellen (KIM et al., 2001) exprimiert. Dieser Rezeptor ist bei der Migration von T-Gedächtniszellen bei Th1-abhängigen Entzündungskrankheiten, z. B. Multipler Sklerose (MS) (CALABRESI et al., 2002), und bei der Verteilung von Plasmazellen im Gewebe (NAKAYAMA et al., 2003) von Bedeutung. CXCR6 kann nach neuen Erkenntnissen als Korezeptor für die HIV-1-Infektion dienen (MURPHY, 2002). Für die FIV-Infektion hat CXCR6 keine Bedeutung.

2.1.2.2. CC-Rezeptoren

Der wichtigste Korezeptor für die Übertragung der HIV-Infektion ist CCR5 (DENG et al., 1996; RANA et al., 1997). Aber auch einige andere CC-Chemokinrezeptoren sind in der Lage, den Viruseintritt zu vermitteln (CCR1, CCR2b, CCR3 und CCR8).

CCR4 ist ein selektiver Rezeptor auf Th2-T-Lymphozyten (ANNUNZIATO et al., 1998). Er wird in hohen Konzentrationen nach T-Zell-Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor exprimiert (SALLUSTO et al., 1999a) und vermittelt die T-Zell-Wanderung vom Gewebe in die Lymphknoten. Außerdem beeinflusst CCR4 die Migration der reifenden T-Zellen durch den Thymus und in verschiedene Lymphgewebe (IMAI et al., 1997a), steuert die Wanderung dendritischer Zellen (SOZZANI et al., 1999a) und basophiler Granulozyten.

CCR6 wird auf inaktiven T-Gedächtniszellen (MAKI et al., 2002) und dendritischen Zellen (SOZZANI et al., 1999a) exprimiert. Er unterstützt die Migration dieser Zellen in sekundäre Lymphorgane und hilft einer Untergruppe der dendritischen Zellen, den Langerhans-ähnlichen dendritischen Zellen, bei der Wanderung in die Epidermis (CHARBONNIER et al., 1999; YANG et al., 1999). Ein wichtiger „homing“-Rezeptor des Immunsystems ist CCR7. Er dirigiert B-Zellen in die Regionen sekundärer Lymphorgane, in denen viele T-Zellen lokalisiert sind (REIF et al., 2002). Seine Expression wird vermehrt auf aktivierten T-Zellen und dendritischen Zellen während der Reifung beobachtet (SALLUSTO et al., 1998b; SALLUSTO et al., 1999a; YANAGAWA und ONOE, 2003). Liganden für CCR7 werden konstitutionell in T-Zell-Zonen sekundärer Lymphorgane und in Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Geweben exprimiert (YOSHIE et al., 1997). FORSTER und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass die Lymphknoten von Mäusen, denen das *ccr7*-Gen fehlt, nicht deutlich

strukturiert sind. Diese Tiere sind nicht in der Lage, eine schnelle Antikörperantwort aufzubauen (FORSTER et al., 1999).

CCR9 ist ein Chemokinrezeptor, an den spezifisch TECK, ein hauptsächlich im Thymus exprimiertes Chemokin, bindet (YOUN et al., 2001). Er findet sich auf der Oberfläche von unreifen und reifen Thymuszellen, und spielt eine Rolle bei der T-Zell-Entwicklung (MIYAZAKI et al., 2002). CCR9 wurde auch auf einigen dendritischen Zellen, aktivierten Makrophagen und Lymphozyten in Schleimhäuten nachgewiesen (MURPHY et al., 2000).

CCR10 wird auf der Oberfläche von differenzierten, ruhenden T-Zellen (WANG et al., 2000) und Haut-assoziierten dendritischen (Langerhans-) Zellen (HOMEY et al., 2000) exprimiert. Über seinen, hauptsächlich in der Haut gebildeten, Liganden CTACK (cutaneous T-cell-attracting chemokine, CCL27) (HOMEY et al., 2002) vermittelt er die T-Zell-Infiltration entzündeter Haut (HUDAK et al., 2002).

2.1.2.2.1. CCR1

CCR1 vermittelt die Wanderung von Immunzellen als Reaktion auf Entzündungen (DOMACHOWSKE et al., 2000; ZOFFMANN et al., 2002). Er wird auf neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten (GAO et al., 1997; ZHANG et al., 1999), auf Monozyten (NARDELLI et al., 1999), Makrophagen (YOUN et al., 1997), unreifen dendritischen Zellen (SALLUSTO et al., 1998b) und auf aktivierten Th1-Zellen (PENNA et al., 2002) exprimiert (Abb. 5 und 6). Auf unreifen T-Zellen wird er nicht exprimiert und auf reifen dendritischen Zellen herunterreguliert (SALLUSTO et al., 1998b; DOMACHOWSKE et al., 2000). CCR1-defiziente Mäuse zeigen bei Infektionen eine reduzierte Reaktion der neutrophilen Granulozyten (GAO et al., 1997).

Einige HIV-Isolate können CCR1 als Korezeptor für den Viruseintritt in die Zelle verwenden (VAN DER MEER et al., 2000). Er kann auch den Eintritt von SIV in Wirtszellen vermitteln (MARGULIES et al., 2001).

2.1.2.2.2. CCR2

CCR2 bindet verschiedene „monocyte chemoattractant“ Proteine (MCP) und ist wichtig bei Entzündungsreaktionen (BAGGIOLINI und LOETSCHER, 2000). Zwei Varianten mit unterschiedlicher Länge, CCR2a und CCR2b, entstehen durch alternatives Splicing (WONG et al., 1997). Beide zeigen gleiche biologische

Funktionen; CCR2b scheint die vorherrschende Form zu sein. CCR2 wird auf Monozyten und Makrophagen (FANTUZZI et al., 1999), unreifen dendritischen Zellen (SALLUSTO et al., 1998b), T-Zellen, NK-Zellen (KIM et al., 2002) und auf basophilen Granulozyten (IIKURA et al., 2001) exprimiert (Abb. 5 und 6). Mäusen, denen CCR2 fehlt, entwickeln sich normal, zeigen jedoch bei Infektionsversuchen reduzierte Makrophagen-Aktivität (MURPHY et al., 2000). Das HIV-Tat-Protein ist ebenfalls ein CCR2-Agonist. Es wird vermutet, dass durch Tat HIV-empfindliche Zellen an die Infektionsstelle gelockt werden (ALBINI et al., 1998). CCR2b kann von manchen R5- und R5/X4-HIV-Stämmen als Korezeptor für die Zell-Fusion genutzt werden (ALKHATIB et al., 1997a; RANA et al., 1997). Eine Mutation eines Allels im *ccr2*-Gen (CCR2-641) kann zu einer verzögerten Progression zum AIDS-Stadium der HIV-Infektion führen (ALVAREZ et al., 1999).

2.1.2.2.3. CCR3

CCR3 wird auf eosinophilen und basophilen Granulozyten, Th2-Lymphozyten (PEASE et al., 1998; SALLUSTO et al., 1998a) und auf dendritischen Zellen, unabhängig von deren Reifung, nachgewiesen (RUBBERT et al., 1998) (Abb. 5 und 6). Er bindet verschiedene entzündliche Chemokine (HEATH et al., 1997) und spielt eine zentrale Rolle bei der allergischen Entzündung (CHENG et al., 2001). Sein wichtigster Ligand ist Eotaxin, das wirksamste Chemokin für eosinophile Granulozyten (NAGASE et al., 2001). FUJISAWA und Mitarbeitern (2000) wiesen nach, dass die Chemokin-abhängige Degranulation von eosinophilen Granulozyten, eine wichtige Funktion dieser Zellen, selektiv durch CCR3 vermittelt wird.

CCR3 kann sowohl von R5- als auch X4- und R5/X4-HIV-Stämmen als Korezeptor verwendet werden (BAZAN et al., 1998; CHOE et al., 1998a), und er kann den Virus-Eintritt in Mikrogliazellen des ZNS vermitteln (HE et al., 1997). Hohe CCR3-Konzentrationen auf der Zelloberfläche können die Effektivität der Korezeptor-Funktion steigern (RUCKER et al., 1997).

2.1.2.2.4. CCR5

Das CCR5-Polypeptid ist 355 Aminosäuren lang und wird von einem einzelnen Exon kodiert. CCR5 wird hauptsächlich auf Makrophagen (ALKHATIB et al., 1996; ZAITSEVA et al., 1997), Monozyten (COMBADIÈRE et al., 1996),

unreifen dendritischen Zellen (RUBBERT et al., 1998; SALLUSTO et al., 1998b), Th1-Zellen (BLEUL et al., 1997; LOETSCHER et al., 1998b) und NK-Zellen (INNGJERDINGEN et al., 2001) exprimiert (Abb. 6). Zusätzlich findet er sich auf Langerhans Zellen (ZAITSEVA et al., 1997), CD4⁺- und CD8⁺-Thymuszellen (ZAITSEVA et al., 1998) und auf Zellen des ZNS (XIA und HYMAN, 1999). Seine Liganden RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) und MIP-1 α und - β (macrophage inflammatory protein) binden mit hoher Affinität, sind aber nicht selektiv für CCR5 (ALKHATIB et al., 1996; COMBADIÈRE et al., 1996; NIBBS et al., 1997a).

CCR5-defiziente Mäuse, wie auch CCR5-defiziente Menschen, erscheinen äußerlich gesund (ZHOU et al., 1998). Es gibt jedoch Hinweise, dass das Fehlen von CCR5 bei Menschen zu einem frühzeitigen Ausbruch von MS führen kann (FAVOROVA et al., 2002).

CCR5 ist der wichtigste Korezeptor für die HIV-Infektion. Er wird von M-tropen, R5-HIV-Stämmen verwendet und die Empfänglichkeit des Wirtes für das Virus wird durch CCR5 kontrolliert (DENG et al., 1996; DORANZ et al., 1996; ALKHATIB et al., 1997b; DRAGIC und MOORE, 1997). Mutationen von CCR5 können die Übertragung und die Progression der HIV-Infektion deutlich verringern bzw. verzögern.

2.1.2.2.5. CCR8

CCR8 wird in hohen Konzentrationen von Thymuszellen exprimiert (LEE et al., 2000) und findet sich auf NK-Zellen (INNGJERDINGEN et al., 2001), Th1- und Th2-Zellen (SALLUSTO et al., 1999a). Die biologische Funktion von CCR8 ist noch nicht eindeutig geklärt; er scheint aber eine Rolle bei allergischen Hautkrankheiten zu spielen (SEBASTIANI et al., 2001).

Von einigen R5-, X4- und R5/X4-HIV-Stämmen wird er als Korezeptor genutzt. Die Infektion über CCR8 kann durch seinen Ligand I-309 gehemmt werden (ZHANG et al., 1998b; LEE et al., 2000).

2.1.2.3. Weitere Chemokinrezeptoren

Zusätzlich zu den CXC- und den CC-Chemokinrezeptoren sind zwei weitere Chemokinrezeptoren bekannt.

2.1.2.3.1. CX3CR1

CX3CR1 vermittelt direkt die Zell-Zell-Adhäsion mit Zellen, die seinen membranständigen Liganden Fraktalkin exprimieren (IMAI et al., 1997b). Dieser Chemokinrezeptor findet sich auf NK-Zellen und T-Lymphozyten (IMAI et al., 1997b; NANKI et al., 2002). Während Entzündungsreaktionen wird die Expression von CX3CR1 auf T-Lymphozyten gesteigert (NANKI et al., 2002). CX3CR1 kann von einigen X4-, R5- und X4/R5-HIV-Stämmen als Korezeptor für den Eintritt in die Zelle verwendet werden (MURPHY et al., 2000).

2.1.2.3.2. XCR1

XCR1 wird auf B-Lymphozyten, aktivierten, antigen-spezifischen T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert (HUANG et al., 2001; KURT et al., 2001). Seine einzigen Liganden sind Lymphotaktin- α und - β , die zusammen mit XCR1 eine entscheidene Rolle bei der Regression von Tumoren spielen können. Das Tumorstadium von Myelomzellen bei Mäusen, die nach Infektion über einen Vektor Lymphotaktin exprimierten, war deutlich verlangsamt im Vergleich zu unveränderten Myelomzellen (CAIRNS et al., 2001; HUANG et al., 2002). Von entscheidender Bedeutung bei der Tumor-Regression war die zellvermittelte Immunität über $CD4^+$ -Th1-Zellen und $CD8^+$ -zytotoxische-T-Zellen (HUANG et al., 2002). Bei der HIV-Infektion spielt XCR1 keine Rolle.

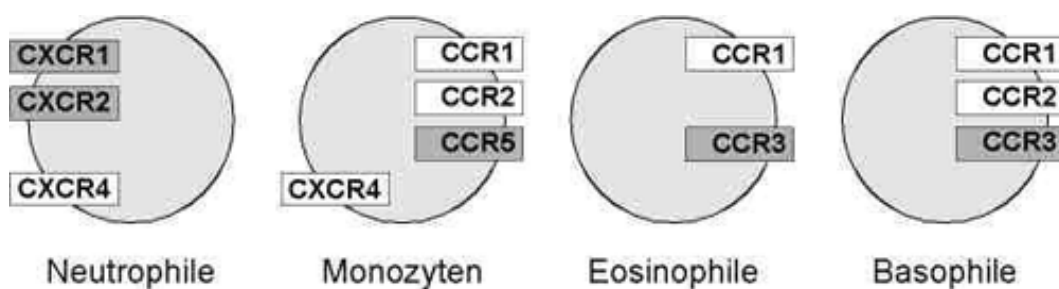


Abb. 5: Verteilung der Chemokinrezeptoren auf Monozyten und auf granulozytären Leukozyten

(www.robert-koch-stiftung.de/bilder/06_abb_1.jpg)

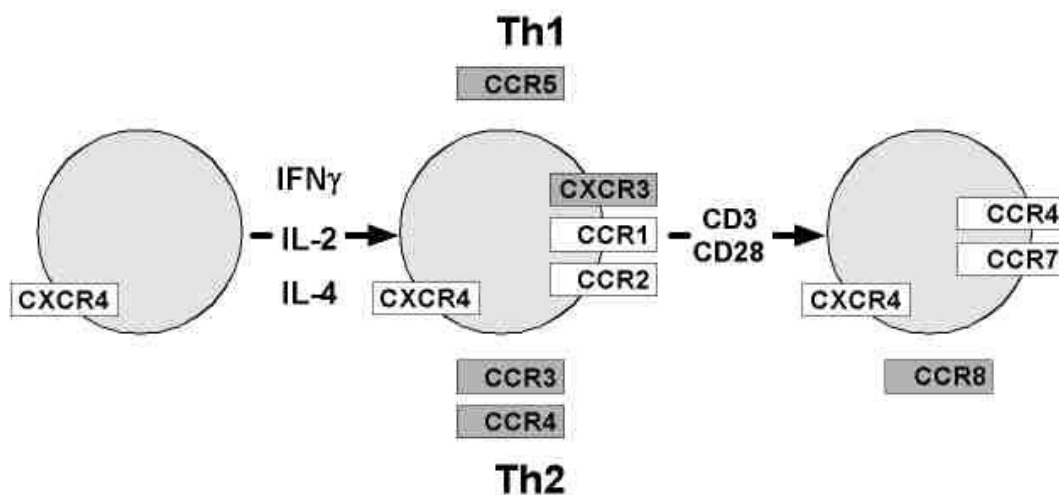


Abb. 6: Verteilung der Chemokinrezeptoren auf T-Lymphozyten in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand (www.robert-koch-stiftung.de/bilder/06_abb_2.jpg)

2.2. Korezeptoren für die HIV- und FIV-Infektion

HIV-Patienten sind in der Regel von mehr als einen Virus-Stamm infiziert. Bei der Infektion mit HIV werden in fast allen Fällen Makrophagen-trope, nicht-synzytienbildende Virusstämme übertragen (DENG et al., 1996; DORANZ et al., 1996; LEE et al., 1998; BERGER et al., 1999a). Diese HIV-Stämme nutzen CCR5 als Korezeptor. Die Infektion kann durch die natürlichen Liganden RANTES, MIP-1 α und - β gehemmt werden (ALKHATIB et al., 1996; COCCHI et al., 1996; ZHANG et al., 1997; GONG et al., 1998). Die R5-Stämme sind pathogen und persistieren während der gesamten Infektion (CHOE et al., 1998b). CCR5 fungiert als Korezeptor bei der Infektion mit HIV-1, HIV-2 und SIV (CHEN et al., 1998; ZHANG et al., 2000). KOVACS und Mitarbeiter (1999) vermuten, dass CCR5 bei der Infektion mit M-tropen FIV-Stämmen eine Rolle spielen könnte.

CXCR4 ist der Rezeptor für T-Zell-trope, synzytienbildende HIV-Stämme (BERSON et al., 1996; FENG et al., 1996; HORI et al., 1998; ZHANG et al., 1998a). Sie treten erst in den späteren Stadien der HIV-Infektion auf (CHOE et al., 1998b). Das Auftreten von X4-Stämmen ist mit deutlicher Reduktion der CD4⁺-T-Helfer-Zellen, einer Inversion des CD4/CD8-Quotienten und der Progression zu AIDS verbunden (XIAO et al., 1998). Nach durchschnittlich fünf Jahren können bei ca. 50 % der HIV-Infizierten Virus-Stämme nachgewiesen werden, die CXCR4 als Korezeptor verwenden (TRKOLA et al., 2002).

Verschiedene HIV-1- und HIV-2-Isolate sind sogar in der Lage, CD4-unabhängig nur über CXCR4 in die Zelle einzudringen (HOXIE et al., 1998; WILLETT et al., 1998).

Für die Fusion mit der Wirtszelle benötigt HIV nur einen Rezeptor. Häufig wird die Infektion nur über CXCR4 vermittelt (WILLETT et al., 1998; FREY et al., 2001). Bis vor einiger Zeit ging man davon aus, dass auch CD9 kann als Rezeptor fungieren kann (WILLETT et al., 1997a). CD9 scheint jedoch nicht als Eintritts-Rezeptor sondern in einem späteren Stadium, beim Viruszusammenbau und der Knospung des Virus eine Rolle zu spielen (DE PARSEVAL et al., 1997). Von SIV wird CXCR4 nur selten verwendet (CHEN et al., 1998; MEISTER et al., 2001), die Fusion kann aber bei SIV auch CD4-unabhängig über die Bindung an CXCR4 ablaufen (LIN et al., 2003).

Einige andere Chemokinrezeptoren können, wie schon beschrieben, ebenfalls den HIV-Eintritt in die Zelle vermitteln (KLASSE et al., 1997). Sie spielen eine untergeordnete Rolle, werden jedoch von wenigen Virusstämmen exklusiv verwendet (HOFFMAN et al., 1998). CCR2 nimmt unter diesen selten genutzten Korezeptoren eine Sonderstellung ein, da die Progression zu AIDS durch eine Mutation im *ccr2*-Gen verzögert werden kann (KOSTRIKIS et al., 1998).

2.2.1. Mutationen in Rezeptoren oder Liganden

Ein geringer Prozentsatz HIV-Infizierter bleibt über lange Zeit symptomfrei und zeigt keine Progression zu AIDS. Sie werden als „long-term non-progressors“ (LTNP) bezeichnet (CAO et al., 1995; PANTALEO et al., 1996). Verglichen mit HIV-Patienten, bei denen die Krankheit schnell fortschreitet, zeigen LTNP einen geringeren Virus-Load, verstärkte HIV-spezifische zellvermittelte Immunität und höhere Titer virusneutralisierender Antikörper (COHEN et al., 1997; PAROLI et al., 2001). Genom-Untersuchungen zeigten, dass LTNP häufig Mutationen in den Genen der Chemokinrezeptoren oder deren Liganden aufweisen (O'BRIEN und MOORE, 2000).

2.2.1.1. CCR5

Mutationen des Chemokinrezeptors CCR5 spielen eine Rolle bei der Übertragung von HIV; sie können bei homozygoten Trägern zu einer hohen HIV-Resistenz führen (WARD und WESTWICK, 1998). Menschen, eine *ccr5*-Gen-Mutation aufweisen, zeigen keine Veränderungen des Phänotyps im Vergleich zu

Gesunden. Die Deletion von 32 bp im *ccr5*-Gen (*CCR5Δ32*) führt zur Produktion eines verstümmelten Proteins, das nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Das Protein bleibt im endoplasmatischen Retikulum und wird dort abgebaut (CAMMACK, 1999). Homozygote Träger dieser Mutation, die bei ca. 1 % der weißen Bevölkerung auftritt (WARD und WESTWICK, 1998), zeigen einen hohen Grad der Resistenz gegenüber der HIV-Infektion. Heterozygote Träger, ca. 10 bis 20 % der Weißen (CAMMACK, 1999) exprimieren auf der Zelloberfläche eine sehr viel geringere Anzahl an CCR5 (VENKATESAN et al., 2002). Sie sind resistenter gegen HIV im Vergleich zu Menschen ohne Genmutation und zeigen eine Verzögerung der Progression zu AIDS (MARMOR et al., 2001). Bei Asiaten und Afrikanern wird *CCR5Δ32* nur sehr selten gefunden. STEPHENS und Mitarbeiter (1998) vermuten einen Ursprung dieser Mutation in Europa, da Träger möglicherweise einen Selektionsvorteil während einer der großen Epidemien, wie Pest oder Pocken, im Mittelalter hatten.

Eine sehr viel seltenere Mutation, *CCR5-m303*, führt bei der Translation zum Kettenabbruch an Position 303 des *CCR5*-Allels (VOEVODIN et al., 1999). Dadurch entsteht ebenfalls ein nicht funktionsfähiges Rezeptorprotein, das sofort wieder proteolytisch abgebaut wird. QUILLEN und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass die Kombination der beiden Mutationen *CCR5Δ32* und *CCR5-m303* im CCR5 die Resistenz gegen die HIV-Infektion verstärkt.

Eine andere natürliche Mutation von CCR5, *CCR5-893*, konnte bisher nur bei Asiaten identifiziert werden. Hier kommt es, wie bei *CCR5-m303*, zu einem frühen Abbruch der Translation und Abbau des Proteins (SHIODA et al., 2001).

2.2.1.2. Andere Rezeptoren

T-trope HIV-Stämme, die in der späten Infektionsphase auftreten können, sind oft in der Lage, zusätzlich zu CXCR4 auch CCR3 und CCR2 als Korezeptoren zu verwenden (CAMMACK, 1999). Eine Mutation in CCR2, *CCR2-64I*, die häufiger bei Afrikanern und Afro-Amerikanern als bei Weißen zu finden ist (WILLIAMSON et al., 2000), hat bei HIV-Patienten einen Krankheitsverzögernden Effekt (MUMMIDI et al., 1998).

Eine Mutation im *cx3cr*-Gen führt bei homozygoten Trägern zur gesteigerten Progression zu AIDS im Vergleich zu anderen HIV-Infizierten (FAURE et al., 2000). Diese Mutation kann auch bei Versagen der antiviralen Therapie eine Rolle spielen (BRUMME et al., 2003).

2.2.1.3. SDF-1

ALVAREZ und Mitarbeiter (1999) wiesen bei HIV-infizierten homozygoten Trägern einer Mutation in der nicht-translatierten 3'-Region des *sdf-1*-Gens, *SDF1-3'A*, einen Aufschub des Fortschreitens zum AIDS-Stadium nach. WINKLER und Mitarbeitern vermuten bei diesen Patienten einem zeitlich verzögerten Wechsel von R5- zu X4-Stämmen. Wahrscheinlich wird diese Verzögerung durch eine verstärkte Expression und Sekretion von SDF-1 bedingt, das die HIV-Bindung an CXCR4 hemmt (O'BRIEN und MOORE, 2000). Im Gegensatz dazu vermuten KOVACS und Mitarbeiter (1999) vermuten aber, dass CCR5 bei der Infektion mit M-tropen FIV-Stämmen eine Rolle spielen könnte. BRAMBILLA und Mitarbeiter (2000), dass der homozygote *SDF1-3'A*-Genotyp mit einer beschleunigten Progression zu AIDS durch den verstärkten Verlust von CD4⁺-Zellen verbunden ist.

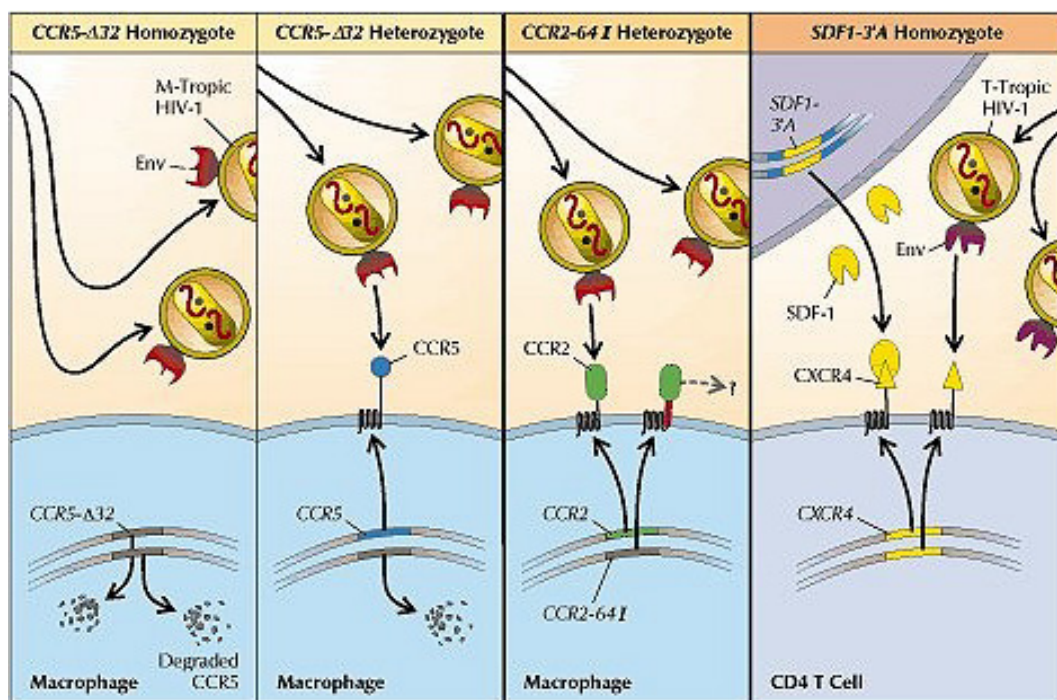


Abb. 7: Darstellung der drei Mutationen *CCR5Δ32*, *CCR2-64I* und *SDF1-3'A* und ihrer Folgen für die HIV-Infektion (www.hosppract.com/issues/1998/07/obrien.htm)

2.2.2. Hemmstoffe der Korezeptoren

Das Env-Glykoprotein gp120 ist für die Bindung an die Oberflächenrezeptoren der Zelle verantwortlich (GALLO und LUSSO, 1997; UGOLINI et al., 1997). Eine Reihe von Molekülen sind in der Lage, die Fusion des HIV oder FIV mit der

Wirtszelle durch selektive Blockade der Korezeptoren CCR5 und CXCR4 zu hemmen (MOORE, 1997).

2.2.2.1. CCR5

Drei verschiedene Kategorien von Hemmstoffen der CCR5-Rezeptorfunktion können unterschieden werden, erstens monoklonale Antikörper (mAk), zweitens Chemokine und deren Derivate, drittens Peptide und kleine Nicht-Peptidmoleküle (DRAGIC, 2001). Die kleinen Nicht-Peptidmoleküle sind meist Antagonisten, deren Bindung an CCR5 keine Signalübertragung induziert. Hemmstoffe des CCR5 spielen bei der Hemmung der HIV-Infektion eine wachsende Rolle. Eine Wirksamkeit bei der Kontrolle der Infektion mit FIV wurde für CCR5-Hemmstoffe bisher nicht nachgewiesen.

2.2.2.1.1. Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope der Rezeptors zeigen unterschiedliche Wirkung auf die Bindung und Fusion von HIV. Gegen das Amino-terminale Ende gerichtete mAk hemmen die Bindung von gp120 an CCR5; die Fusion und der Viruseintritt von HIV-1 werden *in vitro* aber nur schwach gehemmt (LEE et al., 1999; OLSON et al., 1999). Im Gegensatz dazu hemmen mAk gegen die zweite extrazelluläre Domäne von CCR5 die Fusion und den Viruseintritt deutlich, die Bindung jedoch kaum. Ein mAk gegen CCR5, PRO 140, bindet beispielsweise an ein Epitop auf CCR5, das mehrere extrazelluläre Domänen umfasst (OLSON et al., 1999). Er hemmt den CCR5-vermittelten Eintritt verschiedener HIV-1-Stämme *in vitro*. Derzeit existieren keine *in-vivo*-Daten über die Wirksamkeit von PRO 140.

Einige Menschen zeigen durch natürliche CCR5-Antikörper eine immunologische Resistenz gegen HIV. LOPALCO und Mitarbeiter (2000) wiesen bei sechs von 48 HIV-negativen Menschen, die HIV-infizierte Sexualpartner haben, neutralisierende Antikörper gegen CCR5 nach.

Erfahrungen über eine mögliche Beeinflussung der FIV-Infektion durch mAk gegen CCR5 wurden bisher nicht gesammelt.

2.2.2.1.2. Chemokine und Chemokinderivate

Die Chemokine RANTES, MIP-1 α und β wirken an CCR5 als Agonisten, während ihre Derivate, z. B. AOP-RANTES, 9-68-RANTES, Met-RANTES,

Antagonisten sind (AMARA et al., 1997). Sie hemmen den Viruseintritt von HIV durch kompetitive Blockierung einer CCR5-Bindungsstelle (Abb. 8). Die Chemokinderivate sind potenter als die Chemokine (MOSIER et al., 1999). Die natürlichen Chemokine können zudem die HIV-Vermehrung durch Reduktion der CCR5-Dichte auf der Zelloberfläche und damit deren Verfügbarkeit hemmen (HOWARD et al., 1998a). Eine Hemmung von CCR5 mit Chemokinderivaten kann aber auch einen Wechsel der Rezeptorpräferenz provozieren, der zum unerwünschten Auftreten von X4-Stämmen mit einer höheren Virulenz führen kann (MOSIER et al., 1999).

Eine *in-vivo*-Prüfung der Chemokinderivate gegen HIV wurde nicht durchgeführt. Es liegen keine Daten über deren Einfluss auf die FIV-Infektion vor.

2.2.2.1.3. Niedermolekulare Nicht-Peptidmoleküle

Der erste untersuchte Nicht-Peptid-Antagonist gegen CCR5 war TAK-779, ein quartäres Ammoniumderivat (DE CLERCQ, 2000b) mit einem Molekulargewicht von 531 D. TAK-779 bindet kompetitiv zu den natürlichen Liganden an CCR5 und CCR2 und hemmt spezifisch die Bindung von R5-Stämmen (BABA et al., 1999; ZHANG et al., 2000). Dabei bilden die vier Transmembranhelices 1, 2, 3 und 7 von CCR5 eine Bindungstasche, an die TAK-779 andockt (PATERLINI, 2002) und so die Interaktion mit HIV-1 unterbindet (DRAGIC et al., 2000). Die effektive Konzentration, bei der 50 % Replikationshemmung *in vitro* eintrat (EC_{50}), wurde in zwei verschiedenen Zelllinien mit einem R5-HIV-Stamm getestet und lag im nanomolaren Bereich (SHIRAISHI et al., 2000). TAK-779 zeigte keine zytotoxische Wirkung, ist aber bei oraler Gabe schlecht bioverfügbar (SCOZZAFAVA et al., 2002). Ein neues Derivat von TAK-779, TAK-220, ist bei Ratten oral bioverfügbar und hemmt die RANTES-Bindung an CCR5 in nanomolaren Konzentrationen (IIZAWA et al., 2003).

SCH-C (SCH 351125, Schering-Plough), ein Oxim-Piperidin, hemmt selektiv den Viruseintritt über den CCR5-Rezeptor (TREMBLAY et al., 2002). SCH-C ist ein CCR5-Antagonist, dessen Bindung weder zur Signalübertragung noch zur Herunterregulierung von CCR5 führt (STRIZKI et al., 2001). *In-vitro*-Untersuchungen von STRIZKI und Mitarbeitern (2001) zeigten, dass es die HIV-Replikation schon in niedrigen effektiven Konzentrationen hemmt. SCH-C zeigt eine gute orale Bioverfügbarkeit und eine relativ lange Halbwertszeit von fünf bis sechs Stunden. Im April 2001 wurde die Phase-II-Studie mit SCH-C eingestellt,

da die Einnahme in hohen Dosierungen zu einer Verlängerung der QT-Strecke und selten zu Herzrhythmusstörungen führte, die jedoch keine klinischen Symptome hervorriefen (ESTE, 2002). Die Nachfolgesubstanz SCH-350634 soll eine bessere Wirksamkeit und weniger Nebenwirkungen haben (ESTE, 2002).

Ein weiterer niedermolekularer Nicht-Peptid-Antagonist ist das Spirodiketopiperazin E913. Es hemmt *in vitro* die Replikation von primären und laboradaptierten R5-HIV-Stämmen sehr effektiv (MAEDA et al., 2001).

2.2.2.2. CXCR4

Hemmstoffe der Korezeptor-Funktion von CXCR4 werden in wie die CCR5-Inhibitoren in monoklonale Antikörper, Chemokine und Chemokinderivate und niedermolekulare Peptide und Nicht-Peptide eingeteilt. Der hohe Grad der Homologie von 94,9 % der Aminosäuresequenz zwischen felinem und humanem CXCR4 (WILLETT et al., 1997b), hat zur Folge, dass die meisten CXCR4-Inhibitoren auch den feline CXCR4 hemmen (RICHARDSON et al., 1999).

2.2.2.2.1. Monoklonale Antikörper

Während für die Bindung von SDF-1 das Amino-termiale Ende und die dritte extrazelluläre Domäne von CXCR4 von entscheidender Bedeutung sind, ist die Korezeptor-Aktivität von Regionen in der zweiten extrazellulären Domäne abhängig (BRELOT et al., 1997; BRELOT et al., 1999; DORANZ et al., 1999; BRELOT et al., 2000). Mehrere mAk wurden entwickelt, die selektiv an CXCR4 binden. 12G5, ein mAk gegen CXCR4 (ENDRES et al., 1996) hemmt die HIV-Replikation *in vitro* in Abhängigkeit von Zelltyp und Virusstamm. Nicht alle X4-Stämme werden blockiert (MCKNIGHT et al., 1997).

Durch die mAk A145 und A120, die an das Amino-terminale CXCR4-Ende bzw. an Epitope der ersten und zweiten extrazellulären Domäne binden, kann die CXCR4-Korezeptor-Funktion gehemmt werden (TANAKA et al., 2001). Im Gegensatz dazu führt A80, ein Antikörper gegen die dritte extrazelluläre Domäne von CXCR4, zu einer Verstärkung der Infektion mit X4- und R5-Stämmen und induzierte die Bildung von Synzytien (TANAKA et al., 2001).

In der Kontrolle und Therapie der FIV-Infektion spielen gegen CXCR4 gerichtete mAk keine Rolle.

2.2.2.2.2. Chemokine und Chemokinderivate

SDF-1 blockiert die Infektion mit T-tropen HIV-Stämmen (BLEUL et al., 1996; OBERLIN et al., 1996), indem es die Interaktion zwischen CXCR4 und gp120 verhindert und die Endozytose auf der Zelloberfläche befindlicher CXCR4-Moleküle induziert (AMARA et al., 1997) (Abb. 8). SDF-1-Derivate blockieren ebenfalls die HIV-Infektion, sind aber meist zusätzlich Agonisten an CXCR4 (TUDAN et al., 2002). Da die Blockade der CXCR4/SDF-1-Interaktion mit schweren gesundheitlichen Schäden verbunden sein kann (ZOU et al., 1998), sind zur Hemmung der Korezeptor-Aktivität Substanzen notwendig, die die SDF-1-induzierte Signalübertragung nicht blockieren oder aktivieren (HEVEKER et al., 1998).

HEVEKER und Mitarbeiter (1998) entwickelten verschiedene, aus der Sequenz von SDF-1 abgeleitete kleine Peptide und testeten diese auf ihre antiviralen Eigenschaften und ihre Fähigkeit zur Signalübertragung. Ein zehn Aminosäuren langes Peptid, das den Aminosäuren 5 bis 14 des SDF-1 entspricht, zeigte die deutlichste Hemmung des HIV-Eintritts, ohne eine Signalübertragung zu induzieren (HEVEKER et al., 2001).

Intrakine, modifizierte Formen von SDF-1, binden CXCR4 intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum und unterbinden dadurch die Expression von CXCR4 auf der Zelloberfläche (CHEN et al., 1997). Zellen, die das Intrakin SDF-KDEL exprimieren, sind *in vitro* resistent gegen die HIV-Infektion mit T-tropen Stämmen (ENGEL et al., 2000). Zusätzlich blockiert dieses Intrakin als sezerniertes Molekül vorhandene CXCR4 auf anderen Zellen (ENGEL et al., 2000). Bisher wurde die Wirksamkeit *in-vivo* nicht überprüft. Studien über den Einsatz bei der FIV-Infektion sind nicht bekannt.

2.2.2.2.3. Kleine Peptide und Nicht-Peptidmoleküle

Einige niedermolekulare Peptide und Nicht-Peptidmoleküle können selektiv den Chemokinrezeptor und/oder die Korezeptor-Aktivität von CXCR4 blockieren. Dabei interagieren sie an CXCR4 als Antagonisten oder Agonisten.

Das synthetische Peptid T22 ist ein 18 Aminosäuren langes Polyphemusin. Es hemmt durch Anheftung an CXCR4 dessen Korezeptor-Aktivität für X4-Stämme (MURAKAMI et al., 1997), zeigt jedoch keinen Einfluss auf R5-Stämme. T22 wirkt es als Antagonist und blockiert *in vitro* effektiv und konzentrationsabhängig die Bindung von SDF-1 und anti-CXCR4-mAk (MURAKAMI et al., 1999).

Verwandte, verkürzte synthetische Peptide, T134, T140 und TC14012, zeigten *in vitro* noch eine deutlich höhere anti-HIV-Potenz und geringere Zytotoxizität (TAMAMURA et al., 1998; XU et al., 1999). Studien von TAMAMURA und Mitarbeitern (2000) zufolge korreliert bei T22 und seinen Derivaten die Anzahl positiv geladener Aminosäuren mit der anti-HIV-Aktivität.

ALX40-4C, ein Polyarginin, das aus neun Argininmolekülen besteht (CABRERA et al., 2000), war der erste Korezeptor-Inhibitor, der in klinischen Studien bei HIV-Infizierten eingesetzt wurde (O'BRIEN et al., 1996). Es interferiert mit der Bindung von SDF-1 und 12G5 an CXCR4. DORANZ und Mitarbeiter (1997) konnten für ALX40-4C eine Hemmung T-troper HIV-Stämme *in vitro* nachweisen. ALX40-4C ist ein schwacher partieller Agonist an CXCR4, durch dessen Interaktion mit CXCR4 sich die intrazelluläre Kalziumkonzentration geringgradig erhöht (ZHANG et al., 2002).

Das Peptoid CGP64222 wurde ursprünglich als Tat-Hemmstoff entwickelt. Es hält das integrierte Provirus im latenten Stadium, indem es mit der Tat-TAR-Komplexbildung interferiert und die LTR-regulierte Genexpression von HIV-1 hemmt (HAMY et al., 1997; DAELEMANS et al., 1999). Im Jahr 1999 wurde gezeigt, dass CGP64222 die Replikation vieler HIV-1 und -2-Stämme auch durch selektive Bindung an den Chemokinrezeptor CXCR4 unterdrückt (DE CLERCQ, 1999). CGP64222 wirkt als Antagonist und blockiert den SDF-1-induzierten Kalziumeinstrom in die Zelle, hat aber keine Wirkung auf den RANTES-vermittelten Kalziumeinstrom (DAELEMANS et al., 2000). CGP64222 hemmt die Replikation verschiedener HIV-Stämme *in vitro* effektiv (DAELEMANS et al., 2000) und ist wenig zytotoxisch. CGP64222 bindet an die zweite extrazelluläre Domäne von CXCR4 (LABROSSE et al., 1998).

NSC 651016, ein Distamycin-Analog, blockiert ebenfalls den Eintritt von HIV durch Besetzen der Rezeptorbindungsstellen und Reduktion der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche (HOWARD et al., 1998a). Es ist jedoch nicht CXCR4-spezifisch, sondern hemmt auch die HIV-Infektion über die Chemokinrezeptoren CCR5, CCR3 und CCR1 (HOWARD et al., 1998b).

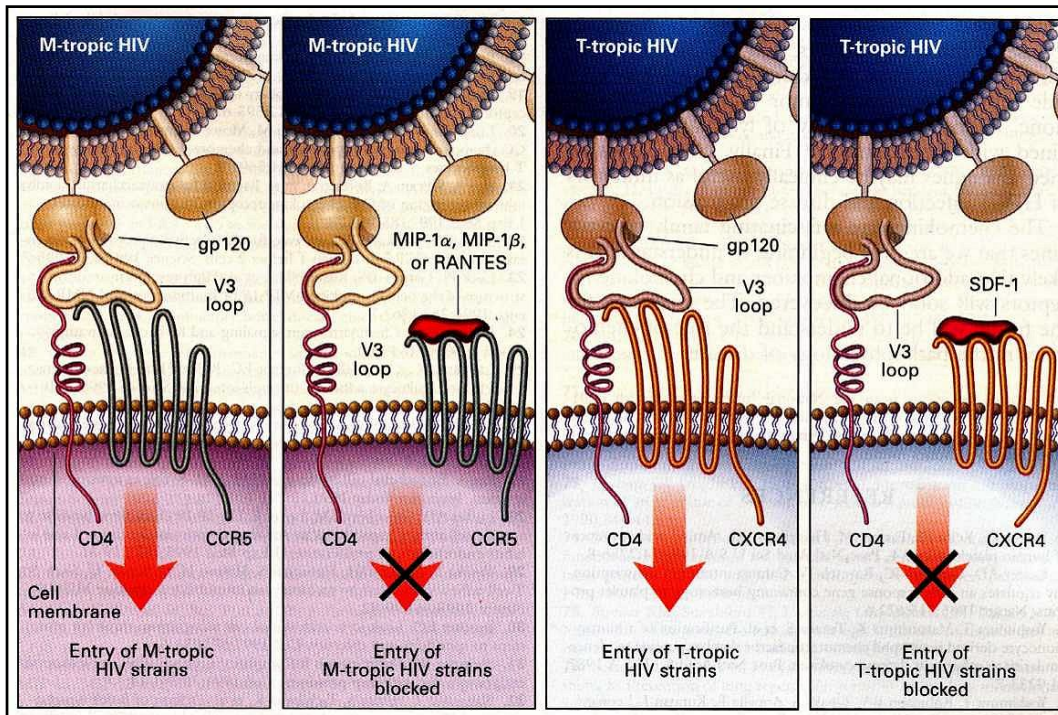


Abb. 8: Bindung von M-tropen und T-tropen HIV-Stämmen an die Wirtszelle und Hemmung des Virusanheftung an CCR5 durch RANTES, MIP-1 α und β und an CXCR4 durch SDF-1

Der Prototyp der Bizyklame AMD3100 (1,1'-[1,4-phenylen-bis(methylen)]bis-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan, MG 830 D) ist ein symmetrisches Molekül, dessen beide Zyklam-Ringe über einen aromatischen Phenylring verbunden sind (DONZELLA et al., 1998; BRIDGER et al., 1999; GERLACH et al., 2001) (Abb. 9). Es ist ein potenter und selektiver Hemmstoff des Chemokinrezeptors CXCR4 (SCHOLS et al., 1997a; DE CLERCQ, 1999; FUJII et al., 2003). AMD3100 unterbindet *in vitro* die CXCR4-abhängige Infektion von HIV (SCHOLS et al., 1997a; DONZELLA et al., 1998; SCHOLS, 1999; DE CLERCQ, 2000a; DE CLERCQ et al., 2001) und FIV (EGBERINK et al., 1999; RICHARDSON et al., 1999; NAKAGAKI et al., 2001). Für die Interaktion von AMD3100 mit CXCR4 sind zwei Aminosäuren, Aspartat 171 und 262 in den Rezeptor-Transmembrandomänen 4 bzw. 6, von entscheidender Bedeutung (GERLACH et al., 2001). Mutationen oder Ersatz dieser beiden Aminosäuren führte zur Resistenz gegenüber dem Bizyklam und zur Verminderung der Korezeptor-Aktivität (LABROSSE et al., 1998; HATSE et al., 2001; ZHANG et al., 2002). AMD3100 bewirkt eine kompetitive Hemmung der 12G5- und SDF-1-Bindung an CXCR4 und hemmt die SDF-1-induzierte Signalübertragung und Rezeptor-Endozytose (DONZELLA et al., 1998; KLASSE et al., 1999; GERLACH et al.,

2001; PRINCEN et al., 2003). Der Kalziumeinstrom an den Chemokinrezeptoren CXCR1 bis CXCR3 und CCR1 bis CCR9 wird durch AMD3100 nicht gehemmt, während es den CXCR4-vermittelten Kalziumeinstrom und Chemotaxis konzentrationsabhängig unterdrückt (HATSE et al., 2002).

DE QLERCQ und Mitarbeiter (1994) zeigten eine Hemmung der HIV-Replikation und der Synzytienbildung *in vitro* bei einer EC₅₀ von 0,01 bis 0,07 µg/ml. Die CC₅₀ lag bei > 500 µg/ml lag. Der SDF-1-vermittelte Kalziumeinstrom wurde durch AMD3100-Konzentrationen zwischen 0,01 nM und 0,1 nM unterdrückt (DONZELLA et al., 1998). AMD3100 selbst bewirkt keine Signalübertragung oder Chemotaxis (VAN OS et al., 2000). Untersuchungen von ZHANG und Mitarbeitern (2002) zufolge scheint es *in vitro* jedoch in Konzentrationen ≥ 100 nM eine Kalziummobilisierung zu induzieren.

AMD3100 ist *in vitro* wirksam gegen T-trope HIV-1- und HIV-2-Stämme (SCHOLS et al., 1997b) und gegen FIV (RICHARDSON et al., 1999). Eine Studie von DATEMA und Mitarbeitern (1996) an HIV-infizierten Mäusen (SCID Maus) zeigte eine statistisch signifikante Reduktion des Virus-Loads T-troper und dual-troper Viren nach parenteraler AMD3100-Gabe in Dosierungen von ≥ 1 mg/kg.

Bei Ratten wurde die geringe orale Bioverfügbarkeit (0,5 bis 9,6%) nachgewiesen (AnorMED, Toxikologische Daten). Toxikologische Untersuchungen der Firma AnorMED ergaben, dass bei Ratten und Hunden eine Dosis von 250 bzw. 600 µg/kg AMD3100 pro Tag keine Nebenwirkungen hervorrief. HENDRIX und Mitarbeiter (2000) führten eine klinische Phase-I-Studie durch, in der zwölf gesunden, freiwilligen Testpersonen AMD3100 entweder intravenös oder subkutan verabreicht wurde. AMD3100 wurde von allen Testpersonen gut vertragen. Es traten nur geringgradige und reversible Nebenwirkungen in Form von Kopfschmerzen, trockenem Mund, Flatulenz, Durchfall und Krämpfen, jedoch keine kardialen Nebenwirkungen auf. Labordiagnostisch verursachte AMD3100 über 24 Stunden eine Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl bis zu 3-fach über dem Ausgangswert, mit einem Maximum nach sechs Stunden. Einige Testpersonen zeigten im Urin eine erhöhte Kalziumausscheidung, bei jeweils einer Person wurde im Serum eine Erhöhung der Laktat-Dehydrogenase bzw. des Magnesiumwertes um 13 % gemessen (HENDRIX et al., 2000).

Zunächst zeigte AMD3100 in klinischen Phase Ib/IIa-Studien eine gute Wirksamkeit. Die weitere Entwicklung als HIV-Medikament wurde jedoch am 25.

Mai 2001 beendet, da es im Zusammenhang mit der intravenösen Gabe von AMD3100 über zehn Tage zu Herzrhythmusstörungen gekommen war. Auch die antivirale Aktivität erschien unzureichend (AnorMED, Produktinformation 2003). Im November 2001 wurde nachgewiesen, dass AMD3100 Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert. Dadurch könnte die Ausbeute an Stammzellen im peripheren Blut vor deren Transplantation erhöht werden (AnorMED, Produktinformation 2003). Derzeit befindet es sich in klinischen Phase-II-Studien bei Tumorpatienten.

Ein neues, oral ausreichend bioverfügbares Bizyklam, das AMD070, erwies sich *in vitro* als selektiver und potenter CXCR4-Antagonist, der die Virus-Replikation einiger X4-HIV-1 und -HIV-2-Stämme, jedoch nicht der R5-Stämme, hemmt (SCHOLS et al., 2003). AMD070 soll 2003 in klinischen Phase-I-Studien getestet werden (SCHOLS et al., 2003).

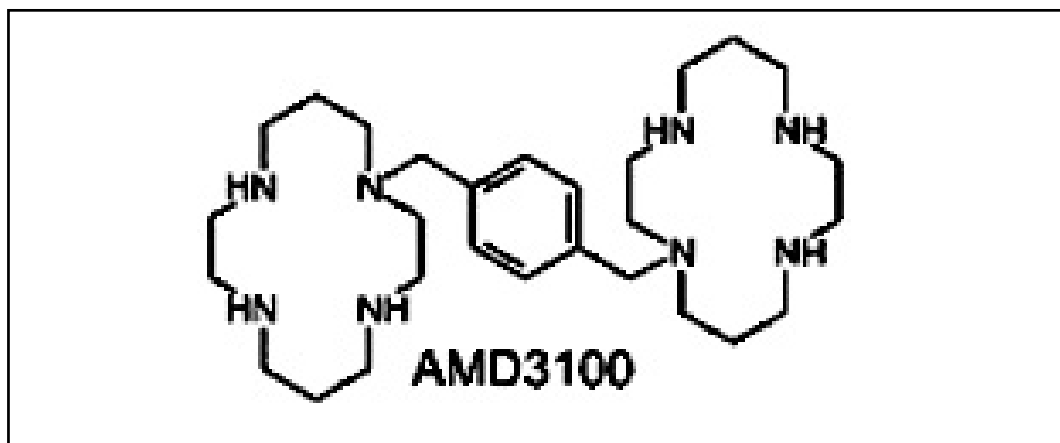


Abb. 9: Struktur von AMD 3100

III. Eigene Untersuchungen

1. Material

1.1. Tiere

Katzenserum wurden mittels ELISA (PetCheck[®] Anti-FIV, IDEXX, Portland, Maine, USA) auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen FIV untersucht. Die Serumproben stammten von Patienten der I. Medizinischen Tierklinik und der Chirurgischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München und von Tierärzten aus ganz Deutschland, überwiegend aus dem süddeutschen Raum. Fünf Proben stammten aus Rom. Zur Untersuchung kamen sowohl Seren von Katzen, die Krankheitssymptome aufwiesen, als auch von Tieren, die im Rahmen einer Routineuntersuchung oder zur Impfung beim Tierarzt vorgestellt wurden.

1.1.1. Einschlusskriterien

An der Therapiestudie nahmen 40 natürlich FIV-infizierte Katzen teil. Von den 83 Katzen, die zwischen Januar 1998 und Mai 2000 als FIV-infiziert identifiziert wurden, waren nicht alle für die vorliegende Studie geeignet. Es wurden nur Tiere in die Studie aufgenommen, die klinisch eine Stomatitis zeigten und bei denen die FIV-DNA in der TaqMan-Polymerasekettenreaktion (PCR) messbar war. Ausgeschlossen wurden Tiere, deren Besitzer einer Therapie nicht zustimmten und Katzen, die aufgrund ihrer Aggressivität ungeeignet waren (Tab.1).

Tab. 1: Einschlusskriterien für die Therapiestudie

	Studienteilnehmer
FIV-ELISA	positiv
Stomatitis	vorhanden
Aggressivität	freundlich bis umgänglich
real-time DNA-PCR	quantifizierbar

1.1.2. Signalement

34 Tiere stammten aus verschiedenen deutschen Regionen (Bayern, Baden-Württemberg, Bremen, Berlin, Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz). Eine Katze stammte ursprünglich aus Irland, eine von Teneriffa, zwei aus Südfrankreich und zwei aus Rom. Alle Tiere hatten vorübergehend die Möglichkeit zu freiem Auslauf. Zum Zeitpunkt der Studie waren 25 Tiere ehemalige Freiläufer, die ab dem Zeitpunkt der Diagnose nur noch in der Wohnung (Wohnungskatze, WK) gehalten wurden, 15 Tieren wurde weiterhin Freilauf gewährt (Freiläufer, FK). 18 Katzen lebten in Einzelhaltung (EH), 16 in Beständen mit bis zu vier Katzen (KG) und sechs in größeren Gruppen (GG). Katzen, die ursprünglich aus Tierheimen stammten, wurden nach Ende der Therapie vermittelt. Von den 40 Studienteilnehmern waren 36 (90 %) europäische Kurzhaarkatzen (EKH) und vier europäische Langhaarkatzen-Mischlinge (LH-Mix).

Nur von 11 Katzen war das Geburtsdatum bekannt, das Alter der anderen war bei der ersten Vorstellung bei einem Tierarzt geschätzt worden. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 6,4 Jahre und lag zwischen 11 Monaten und 11,5 Jahren. Bei den Katzen handelte es sich um 28 Kater (70 %, mk) und 12 weibliche Katzen (30 %, wk). Alle Tiere waren zu Beginn der Studie kastriert (Tab.2 bis Tab.5).

Tab.2: Eigenschaften der Studienteilnehmer in der Placebogruppe

Katze	Herkunft	Alter	Geschlecht	Rasse	Haltung	Freilauf
Mäusebär	Bayern	5,5	mk	EKH	KG	ja
Floh	München	5,1	mk	EKH	KG	nein
Minou	Bremen	11,6	mk	EKH	EH	nein
Silver	München	10,3	mk	EKH	GG	nein
Piagnona	Rom	8,0	wk	EKH	GG	ja
Dennis	Nordrhein-W.	1,0	mk	EKH	KG	ja
Willi	Bayern	10,8	mk	EKH	KG	ja
Immi	München	6,3	wk	EKH	GG	nein
Karl	München	6,7	mk	EKH	EH	nein
Mikesch	München	5,0	mk	EKH	EH	nein

Tab.3: Eigenschaften der Studienteilnehmer in der AMD-Gruppe

Katze	Herkunft	Alter	Geschlecht	Rasse	Haltung	Freilauf
Nikodemus	Trier	4,5	mk	LH-M.	EH	ja
Pico	München	4,3	mk	EKH	EH	nein
Whisky	Berlin	7,5	wk	EKH	EH	ja
Queeny	Irland	1,5	wk	EKH	KG	nein
Imelda	München	5,5	wk	EKH	GG	nein
D'Artagnan	Niedersachsen	1,4	mk	LH-M.	KG	ja
Mauser	Bayern	6,5	mk	EKH	KG	ja
Gipsy	Bayern	3,0	wk	EKH	EH	nein
Lupus	Nürnberg	9,0	mk	LH-M.	EH	nein
Pidi	Teneriffa	5,1	mk	EKH	EH	nein

Tab.4: Eigenschaften der Studienteilnehmer in der PME-A-Gruppe

Katze	Herkunft	Alter	Geschlecht	Rasse	Haltung	Freilauf
Kassandra	Bayern	2,5	wk	EKH	KG	ja
Nicki	Freising	9,9	mk	EKH	EH	nein
Pucky	Frankreich	4,0	mk	EKH	EH	nein
Franze	München	9,1	mk	EKH	KG	ja
Iozzo	Rom	7,8	mk	EKH	GG	ja
Henry	München	10,9	mk	EKH	KG	nein
Jakob	München	8,0	mk	EKH	KG	nein
Cidi	Bayern	8,9	wk	EKH	EH	nein
Camille	Frankreich	6,0	mk	EKH	KG	nein
Sarah	Bayern	2,5	wk	EKH	EH	ja

Tab.5: Eigenschaften der Studienteilnehmer in der PME-A/AMD-Gruppe

Katze	Herkunft	Alter	Geschlecht	Rasse	Haltung	Freilauf
Hank	München	10,0	mk	EKH	KG	nein
Mikesch	Bayern	4,0	mk	EKH	EH	nein
Speedy	Stuttgart	3,4	wk	EKH	EH	nein
Tiger	Bayern	10,6	mk	EKH	KG	ja
Franz-H..	München	8,5	mk	EKH	EH	ja
Olga	Bayern	8,5	wk	EKH	EH	nein
Leo	Bayern	11,0	mk	EKH	KG	nein
Augi	Bayern	11,0	mk	EKH	GG	nein
Ellie	Bayern	0,9	wk	EKH	EH	nein
Odin	Niedersachsen	2,0	mk	LH-M.	KG	ja

1.2. Medikamente

1.2.1. PMEA

Das azyklische Nukleosidphosphonat (*R*)-9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)-adenin (PMEA) wird in hohen intrazellulären Konzentrationen durch das zelluläre Enzym Adenosinphosphat-Kinase phosphoryliert. Dabei entsteht in zwei Schritten PMEApp, das Diphosphat des PMEA, das von der Reversen Transkriptase anstelle eines Adenosintriphosphats in die neu gebildete DNA eingebaut wird. Der Einbau führt zum Kettenabbruch. PMEA und verwandte Nukleosidphosphonate sind *in vivo* gegen ein breites Spektrum von Retroviren, z. B. HIV und FIV, wirksam (BALZARINI und DE CLERCQ, 1991; BALZARINI et al., 1991; HARTMANN et al., 1994). *In-vivo*-Studien zeigten bei FIV-infizierten Katzen Nebenwirkungen in Form von Anämie und Leukozytopenie (HOOVER et al., 1991; DONATH, 1992; HOOVER et al., 1992).

Das Medikament wurde von der Firma Gilead Sciences, Foster City, CA, USA, zur Verfügung gestellt. Es wurde im Institut von Prof. Dr. Balzarini (Rega Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Belgien) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und steril abgefüllt. Von der gelösten Substanz wurden zweimal wöchentlich 10 mg/kg KM subkutan appliziert. Die Wahl der Dosierung erfolgte aufgrund der Pharmakokinetik-Studien von EGBERINK und Mitarbeitern (1990a) und NAESENS (1993), das Applikationsintervall wurde nach Studienergebnissen von BALZARINI und Mitarbeitern (1990) und NAESENS und Mitarbeitern (1991) festgelegt.

1.2.2. AMD3100

Bizyklame sind dimere Nicht-Peptide mit einem niedrigem Molekulargewicht, die selektiv den Chemokin-Rezeptor CXCR4 blockieren und dadurch den Eintritt von HIV und FIV in die Wirtszelle verhindern (DONZELLA et al., 1998; EGBERINK et al., 1999). Das 1,1'-[1,4-Phenyl-bis(Methylen)]-bis(1,4,8,11-Tetraazacyklo-tetradekan)-Oktachlorid-Dihydrat (AMD3100) ist der Prototyp der Bizyklame.

Die Substanz wurde von Prof. G. Henson (AnorMED, Langley, British Columbia, Kanada) zur Verfügung gestellt und im Institut von Prof. Dr. J. Balzarini in PBS in einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst und steril abgefüllt. Die verwendete Dosierung von 0,5 mg/kg KG wurde zweimal täglich im Abstand

von 12 Stunden subkutan appliziert. Dosierung und Applikationsintervall wurden nach Pharmakokinetik- und Toxizitätsstudien (siehe Literaturübersicht 2.3.1.3.1. AMD3100), die im Labor der Firma AnorMED durchgeführt worden waren, sowie nach den Ergebnissen der Voruntersuchungen (siehe 2.1. Voruntersuchung) festgelegt.

1.2.3. Placebo

Als Placebo diente steriles PBS, das auch als Lösungsmittel für PMEA und AMD 3100 verwendet worden war. Die Vorbereitung und Kodierung der Medikamente erfolgte im Institut von Prof. Dr. Balzarini. Alle Medikamente waren in 50 ml oder 100 ml Durchstechflaschen steril abgefüllt und die Flaschen mit roten und blauen Zahlen markiert.

2. Methoden

2.1. Voruntersuchung

Das Bizeyklam AMD3100 blockiert die Bindung von SDF-1 an den Chemokin-Rezeptor CXCR4. SCHOLS und Mitarbeiter wiesen 1997 durch Messung des Kalziumeinstroms in die Zelle nach, dass die Bindung von AMD3100 die Signalübertragung an CXCR4 vollständig hemmt. Im Zuge der Toxizitätsstudien im Labor der Firma AnorMED konnte keine Veränderung des Serumkalziums nachgewiesen werden, jedoch wurde bei Hunden eine geringgradige Abnahme des Magnesiumwerts im Serum festgestellt (Henson, G. persönliche Mitteilung).

Eine Studie an Mäusen zeigte, dass Tiere, denen CXCR4 oder SDF-1 fehlt, gravierende kardiale Defekte entwickeln und nicht lebensfähig sind (ZOU et al., 1998). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vor Beginn der Therapiestudie der Einfluss von AMD3100 auf die Herzaktion und die Serumwerte von Kalzium und Magnesium untersucht. Zusätzlich wurde vor Applikation und nach 24 Stunden ein Blutbild mit Differentialblutbild erstellt (siehe 2.2.3.2.1.) und eine klinisch-chemische Serumuntersuchung (siehe 2.2.3.2.2.) durchgeführt.

2.1.1. Durchführung

Zwei FIV-infizierten Katzen, die keine klinische Symptome aufwiesen, wurde AMD3100 entweder subkutan oder intravenös injiziert. Es wurden mit jedem Tier zwei Untersuchungen im Abstand von 5 Tagen durchgeführt, wobei Katze 1 je 0,5 mg/kg und Katze 2 je 1 mg/kg verabreicht wurde (Tab. 6).

Tab. 6: Medikamentengabe bei der Voruntersuchung

Tag	Katze 1	Katze 2
1	0,5 mg/kg subkutan	1 mg/kg subkutan
6	0,5 mg/kg intravenös	1 mg/kg intravenös

2.1.2. Untersuchungen

Zur Kontrolle der Serumwerte von Kalzium und Magnesium wurde den Katzen vor Verabreichung des AMD3100 und dann nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten sowie nach 6, 12 und 24 Stunden Blut (Beschreibung siehe 2.4.2.1.) aus der *Vena saphena medialis* entnommen. Die Serumgewinnung und die Messung von Kalzium und Magnesium erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.2.2. beschrieben.

Die elektrische Aktivität des Herzens wurde mittels der EKG-Messung (EKG-Gerät Typ Cardiovit AT-10, Firma Schiller, Baar, Schweiz) kontrolliert. Für die Ableitung an den Extremitäten wurde die bipolare Standardableitung nach EINTHOVEN gewählt, die sich für die Untersuchung von Veränderungen der P-QRS-T-Ausschläge und für die Diagnostik von Arrhythmien am besten eignet (TILLEY, 1997). Die Katzen befanden sich in rechter Seitenlage, die drei Ableitungselektroden wurden an den beiden Vordergliedmaßen und der linken Hintergliedmaße befestigt. Über die Elektrode an der rechten Hintergliedmaße wurde der Patient geerdet. Die Messung erfolgte in den ersten beiden Stunden als Dauer-EKG, das vom Untersucher am Bildschirm verfolgt wurde. Vor Medikamentengabe und nach 30, 60 und 120 Minuten wurde das EKG über eine Minute aufgezeichnet. Die weitere EKG-Aufzeichnung wurde jeweils über 1 Minute vor den Blutabnahmen nach 6, 12 und 24 Stunden durchgeführt (Tab. 7).

Tab. 7: Bestimmung der Kontrollparameter

Parameter	Kontrollzeitpunkt
Kalzium und Magnesium im Serum	0, 5, 15, 30, 60, 120 Minuten 6, 12, 24 Stunden
EKG-Messung	0, 30, 60, 120 Minuten 6, 12, 24 Stunden
Blutbild und klinisch-chemische Laboruntersuchung	0, 24 Stunden

2.2. Therapiestudie

2.2.1. Auswahl der Katzen

In die vorliegende Studie wurden nur natürlich FIV-infizierte Katzen aufgenommen. Um möglichst viele Katzen auf das Vorliegen einer FIV-Infektion zu testen, wurde ein Testsystem verwendet, das geeignet ist, große Probenzahlen einfach und mit geringem Zeitaufwand zu bearbeiten. Daher wurde der ELISA PetCheck® Anti-FIV der Firma IDEXX, Portland, Maine, USA, eingesetzt. Der Test arbeitet nach dem ELISA-Prinzip und weist Antikörper nach, die gegen das Kapsidprotein p24 des FIV gerichtet sind.

Eventuell im Katzenserum vorhandene Antikörper banden an FIV-p24-Antigen, das fest an die Wände der ELISA-Reaktionsgefäße gebunden war. Anschließend wurde mit Meerrettichperoxidase konjugiertes FIV-Antigen zugegeben, das an die fixierten Anti-p24-Antikörper band. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden ungebundenes Konjugat und unspezifische Antikörper ausgewaschen. Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse wurde fünf mal gespült. Durch Zusetzen des hydrolysierbaren Substrats Tetramethylbenzidinperoxid wurde eine Farbreaktion ausgelöst. Ein positives Ergebnis wurde durch eine, der Antikörperkonzentration proportionalen, türkisblaue Färbung angezeigt. Serumproben, die positiv reagierten, wurden in drei voneinander unabhängigen ELISA bestätigt.

Von allen positiv-getesteten Katzen wurde eine real-time-PCR mittels TaqMan-Verfahren durchgeführt. (Beschreibung siehe 2.4.4.2.). Nur Katzen, bei denen Virus-DNA mittels TaqMan-PCR nachgewiesen werden konnte, wurden in die Studie aufgenommen.

2.2.2. Aufbau der Studie

40 natürlich FIV-infizierte Katzen wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen mit PMEA, AMD3100 und/oder Placebo behandelt. Die Durchführung als placebokontrollierte Doppelblindstudie ermöglichte eine objektive Beurteilung der klinischen Parameter. Weder dem Tierbesitzer noch dem Untersucher oder einer anderen Person, die mit den Patienten oder den untersuchten Proben Kontakt hatte, war bis zum vollständigen Vorliegen aller Daten die Zugehörigkeit zu den Medikamentengruppen bekannt. Eine Ausnahme bildete Dr. H. Egberink, der die Gruppenzugehörigkeit der Katzen kannte und nur die Blutproben der Tiere untersuchte, die AMD3100 erhielten. Die Zuweisung der Katzen zu den einzelnen Gruppen, sowie die Kodierung der Medikamente wurde im Rega Institut (Katholieke Universiteit Leuven, Belgien) unter Leitung von Prof. Dr. J. Balzarini vorgenommen. Die Dekodierung erfolgte erst nach Abschluß der Studie und Auswertung aller Parameter.

Es wurden vier Gruppen gebildet, die aus je zehn Tieren bestanden. Die Patienten wurden chronologisch nummeriert und bekamen randomisiert eines der mit Zahlen gekennzeichneten Medikamentenpaare zugewiesen. Die Tiere erhielten die ihrem Körpergewicht entsprechende Medikamentenmenge appliziert. Da die Zuordnung zu einer Medikamentengruppe zufällig erfolgte, waren die Katzen in den vier Gruppen in Bezug auf ihren Krankheitsstatus sehr heterogen. Bei der Applikation war der durchführenden Person nicht bekannt, ob Wirkstoff oder Placebo injiziert wurde. Gruppe 1 erhielt nur Placebo-Injektionen, Gruppe 2 AMD3100 und Placebo, Gruppe 3 Placebo und PMEA und Gruppe 4 AMD3100 und PMEA. Über den Therapiezeitraum von sechs Wochen erhielt jedes Tier zweimal täglich sein Medikament aus der Flasche mit der blauen Zahl und zweimal pro Woche, jeweils am Montag und am Donnerstag sein Medikament aus der Flasche mit der roten Zahl. Die Präparate wurden subkutan an der seitlichen Brustwand injiziert. Beide Medikamente lagen in klarer, wäßriger Lösung vor. Die Konzentration war so gewählt, dass jeweils 1 ml pro kg KM verabreicht

werden sollte (Tab. 8). Dadurch wurde sichergestellt, dass die Zugehörigkeit zu den einzelnen Gruppen nicht erkennbar war.

Tab. 8: Einteilung der Katzen in die vier Gruppen

Gruppe	blau beschriftete Flasche	rot beschriftete Flasche
1	Placebo	Placebo
2	AMD3100 0,5 mg/kg q 12 h	Placebo
3	Placebo	PMEA 10 mg/kg 2 x pro Woche
4	AMD3100 0,5 mg/kg q 12 h	PMEA 10 mg/kg 2 x pro Woche

2.2.3. Parameter zur Beurteilung der Wirksamkeit

Zur Beurteilung der Wirksamkeit und des Therapieerfolges, sowie eventuell auftretender Nebenwirkungen der Medikamente, wurden klinische, labordiagnostische, immunologische und virologische Parameter bestimmt. Zudem wurde eine mögliche Resistenzentwicklung *in vitro* untersucht.

2.2.3.1. Klinische Parameter

Ein Kriterium zur Beurteilung der Wirksamkeit der Medikamente war die Verbesserung klinischer Veränderungen. Zu Beginn der Therapie und dann in wöchentlichen Abständen wurden die Patienten einer ausführlichen klinischen Untersuchung unterzogen. Alle vorhandenen Symptome wurden beurteilt und in einem speziell angefertigten Untersuchungsbogen protokolliert (siehe Anhang I). Das Fehlen eines Symptoms wurde mit „Null“, die maximale Ausprägung mit „Zehn“ bewertet.

Alle 40 Katzen wiesen Entzündungen der Maulhöhle auf. Zusätzlich zeigten 19 Katzen eine geringgradige Konjunktivitis (47 %), acht hatten Nasenausfluss (20%). Ein Tier litt schon seit langem unter Hautveränderungen, diagnostiziert als eosinophiles Granulom. Drei Katzen zeigten unter chronische Abmagerung und reduzierte Futteraufnahme. Weitere Befunde waren bei zwei Katzen eine chronische Niereninsuffizienz und bei zwei Tieren eine Hornhauttrübung. Hierbei handelte es sich um irreversible Folgen früherer Augenkrankheiten (Tab. 9). Neben der Entzündungen der Maulhöhle war der am häufigsten erhobene Befund

die Konjunktivitis. Diese Symptome wurden statistisch ausgewertet, die anderen Befunde gingen wegen zu geringer Fallzahl nicht in die Auswertung ein.

Tab. 9: Verteilung der klinischen Veränderungen bei den Katzen der vier Behandlungsgruppen

	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA	Gesamtzahl
Entzündungen der Maulhöhle	10	10	10	10	40
Konjunktivitis	4	5	5	5	19
Erbrechen	2	0	3	1	6
Rhinitis	2	2	2	2	8
Abmagerung	2	0	1	0	3
Niereninsuffizienz	1	0	1	0	2
Hornhauttrübung	0	0	1	1	2
Hautveränderung	1	0	0	0	1

2.2.3.1.1. Körpermasse

Als Maß für den Allgemeinzustand und die Futteraufnahme wurde das Körpergewicht bestimmt. Das Gewicht der Tiere wurde alle zwei Wochen mit einer Säuglingswaage (Fa. Söhnle, Murrhardt, Deutschland) ermittelt und protokolliert.

2.2.3.1.2. Karnofsky-Index

Zur Beurteilung der Lebensqualität (QoL, „Quality of Life“) der Katzen wurde der von David A. KARNOFSKY (1948) für die Humanmedizin entwickelte und von HARTMANN und KUFFER (1998) für die Katze modifizierte Karnofsky-Index herangezogen (Tab. 10). In den modifizierten Karnofsky-Index gingen das Freß-, Spiel-, Sozial- und Komfortverhalten sowie der Gesundheitszustand der Tiere ein. Die Skala reichte absteigend von 100 % für sehr gutes Allgemeinbefinden bis 0 % im Todesfall. Der Karnofsky-Index für die Katze ermöglichte eine quantitative Beurteilung der Lebensqualität und eine objektive Vergleichbarkeit verschiedener Patienten. Der Karnofsky-Index wurde zu Beginn der Studie und danach alle zwei Wochen beurteilt.

Tab. 10: Karnofsky-Index, modifiziert für die Katze nach HARTMANN und KUFFER (1998)

Grad	Befund
100 %	Ungestörtes Allgemeinbefinden, keine Beschwerden, keine Anzeichen für eine Krankheit
90 %	Geringe Anzeichen einer Krankheit, normales Sozial-, Freß- und Ruheverhalten
80 %	Einige Anzeichen einer Krankheit, Freßverhalten ungestört, Sozial- und Komfortverhalten geringgradig reduziert, ausgeprägte, länger anhaltende Ruhephasen, „normale“ Aktivitäten nur mit Anstrengung möglich
70 %	Spiel-, Sozial- und Komfortverhalten reduziert, Freßverhalten geringgradig reduziert, wirkt matter als gewöhnlich, etwas weniger Appetit und geringere Futteraufnahme, erhöhtes Schlafbedürfnis
60 %	Spiel-, Sozial- und Komfortverhalten reduziert, benötigt gelegentlich Pflege und Hilfe beim Putzen und manchmal spezielle Zuwendung bei der Aufnahme von Futter
50 %	Benötigt ständig Pflege, Zuwendung beim Fressen sowie gelegentlich Medikamente, putzt sich nicht mehr selbständig
40 %	Benötigt ständig Pflege, Zuwendung beim Fressen sowie dauerhafte Medikamente, in freier Natur akute Lebensgefahr, Ausscheidungsverhalten gestört (nicht mehr stubenrein)
30 %	Stark pflegebedürftig, Pflege kann nicht mehr vom Besitzer durchgeführt werden, stationäre Aufnahme angezeigt, keine selbständige Futteraufnahme mehr, noch keine Lebensgefahr
20 %	Sehr krank, stationäre Aufnahme unbedingt angezeigt, Ernährung parenteral über Infusionen notwendig
10 %	Akute Lebensgefahr, rasch fortschreitende Verschlechterung
0 %	Tod

2.2.3.1.3. Entzündungen der Maulhöhle

Das Maß der Maulhöhlenentzündung ergab sich aus der Gesamtheit der Veränderungen in der Maulhöhle, bestehend aus Gingivitis und Stomatitis. Unter Stomatitis wurden alle Entzündungen zusammengefaßt, die die Maulhöhle betrafen, mit Ausnahme des Zahnfleisches. Stärke und Ausdehnung der

Entzündung wurden getrennt voneinander anhand eines 10-Punkte-Schemas beurteilt und die Werte dann miteinander multipliziert. Die Entzündung der Maulhöhle errechnete sich aus der Summe der Werte von Stomatitis und Gingivitis, geteilt durch zwei (Tab. 11).

Tab. 11: Punkteschema zur Beurteilung der Maulhöhlenentzündung

Stomatitis	Stärke (0 bis 10) X Ausdehnung (0 bis 10)
Gingivitis	Stärke (0 bis 10) X Ausdehnung (0 bis 10)
Maulhöhlenentzündung	(Stomatitis + Gingivitis) : 2

2.2.3.1.4. Konjunktivitis

19 Tiere zeigten eine Konjunktivitis. Die Beurteilung des Augenausflusses wurde getrennt nach Qualität und Quantität beurteilt. Jeder Qualität (serös, seromukös, mukös, mukopurulent, purulent) war eine Punktezahl zugeordnet (2, 4, 6, 8, bzw. 10). Weiterhin wurde die Stärke der Rötung und der Schwellung von null bis zehn bewertet und miteinander multipliziert. Der Gesamtwert für den Grad der Konjunktivitis ergab sich aus der Summe der Punkte aus entzündlichen Veränderungen der Bindehaut und der Punkte des Augenausflusses, geteilt durch zwei (Tab. 12).

Tab. 12: Punkteschema zur Beurteilung der Konjunktivitis

entzündliche Veränderung	Rötung (0 bis 10) X Schwellung (0 bis 10)
Augenausfluß	Quantität (0 bis 10) X Qualität (2, 4, 6, 8 oder 10)
Konjunktivitis	(entzündliche Veränderung + Augenausfluß) : 2

2.2.3.2. Labordiagnostische Parameter

Die hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter wurden im Labor der I. Medizinischen Tierklinik München bestimmt, um den Erfolg und mögliche Nebenwirkungen der Therapie zu erfassen. Dazu wurde den Tieren zu Therapiebeginn und dann alle zwei Wochen, nach Desinfektion der Haut, Blut mittels steriler Einmalkanülen (Sterican® 0,90 x 40 mm, Braun, Melsungen,

Deutschland) aus der *Vena cephalica antebrachii* entnommen. Die Blutentnahme erfolgte frei abtropfend, das Blut wurde in mit EDTA beschichteten oder unbehandelten Kunststoffröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Neben den für die Therapiekontrolle notwendigen Blutabnahmen, wurden auch Blutuntersuchungen durchgeführt, wenn der Zustand eines Tieres dies erforderte.

2.2.3.2.1. Hämatologische Parameter

Die Gesamtleukozytenzahl, der Hämatokrit und der Hämoglobinwert wurden mit dem Cell-Dyn[®] 3500 R (Firma Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA) automatisch bestimmt. Das Differentialblutbild wurde nach Färbung der Blutausstriche mit dem Gerät Hema-Tek[®] 2000 (Bayer Diagnostics, Fernwald, Deutschland) durch Auszählen von 100 Zellen manuell erstellt. Der Hämatokrit wurde zusätzlich nach dreiminütigem Zentrifugieren einer mit Vollblut gefüllten Heparinmikrozentrifugenkapillare bei 10.000 U/min in einer Mikrohämatokrit-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) und anschließendem Ablesen des Wertes mit Hilfe der Hämatokritkarte bestimmt.

2.2.3.2.2. Klinisch-chemische Laborparameter

Das Serum für die Untersuchungen wurde nach zehnminütigem Zentrifugieren von Vollblut in 5-ml-Serumröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 4000 U/min gewonnen. Gemessen wurden die Enzyme Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alanin-Amino-Transferase (ALT), alkalische Phosphatase (AP), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), α -Amylase, Lipase, die Substrate Harnstoff, Kreatinin, Glukose, Gesamtbilirubin, Gesamteiweiß, Albumin, die Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, anorganisches Phosphat, Magnesium und die Serumeiweißfraktionen. Enzyme, Substrate, anorganisches Phosphat und Magnesium wurden mit dem Hitachi 717[®] Autoanalyzer (Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland) photometrisch bestimmt. Die Elektrolyte Natrium, Kalium und Kalzium wurden mit dem Flammenphotometer Effox 5053[®] (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und Chlorid mit dem Chloridanalyser Corning 925[®] (Corning, Gießen, Deutschland) ermittelt. Die

Serumeiweißfraktionen wurden mit dem Elektrophoresegerät Elphor Vario V[®] (Bender & Hobein GmbH, München, Deutschland) gemessen.

2.2.3.3. Immunologische Parameter

Um den Immunstatus vor Beginn der Therapie und den Einfluß der Medikamente auf das Immunsystem der FIV-infizierten Katzen zu beurteilen, wurden an Tag 0 und danach alle zwei Wochen die T-Lymphozytensubpopulationen bestimmt. Es wurden der relative und absolute Anteil der CD4⁺- und der CD8⁺-Zellen sowie das CD4/CD8-Verhältnis ermittelt.

2.2.3.3.1. Markierung der Zellen

Zur Messung der relativen Anzahl der CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten im Durchflußzytometer wurden die Zellen zunächst gefärbt. Der Vorgang der Markierung der CD4- und CD8-Rezeptor-tragenden T-Lymphozyten mittels einer Kombination verschiedener Antikörper sowie deren Immunfluoreszenzfärbung wurden bei HOFFMANN-FEZER und Mitarbeitern (1991) und beschrieben. Die Färbung erfolgte durch mit Phycoerythrin (PE, rot) oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün) markierte Antikörper, die entweder an den CD4-, CD8- oder CD3-Rezeptor der T-Zellen banden. Anhand der jeweils spezifischen Lichtemissionen der Fluorochrome (PE, FITC) werden die Zellen im Durchflußzytometer differenziert.

Zunächst wurden jeweils 70 µl EDTA-Vollblut in fünf verschiedene FACS-Scan-Röhrchen pipettiert. Röhrchen 1 diente als Kontrolle und enthielt keine farblich markierten Antikörper. In die Röhrchen 2 bis 5 wurden unterschiedliche Kombinationen farblich markierter Antikörper pipettiert, jeweils in einer Menge von 7 µl (Tab. 13). Der Inhalt der Röhrchen wurde gemischt (Vortex Genie[®], Benda und Hobein AG, Zürich, Schweiz) und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um die noch in der Lösung enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, wurde jedem Röhrchen 1,4 ml der 1:10 mit *aqua dest.* verdünnten Simultest[®]/MK Plus Lysing Solution (Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) zugesetzt, gemischt und die Lösung dann fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 U/min wurde der Überstand dekantiert, das Pellet gewaschen und mit 3 ml PBS aufgeschwemmt, der Waschvorgang wurde zwei

mal wiederholt. Letztendlich wurde das Zellpellet in 2 ml PBS gelöst und diese Lösung mit dem Durchflusszytometer untersucht.

Tab. 13: Antikörpermarkierungen in Röhrchen Nr. 1 bis 5 (Mouse IgG = Mäuseimmunglobulin; FITC = Fluoresceinisothiocyanat-markiert; PE = Phycoerythrin-markiert; AK = Antikörper)

Röhrchen	Antikörper 1	Antikörper 2
1	leer	leer
2	Mouse-IgG-FITC	Mouse-IgG-PE
3	anti-CD4-AK-PE	anti-CD3-AK-FITC
4	anti-CD8-AK-PE	anti-CD3-AK-FITC
5	anti-CD4-AK-FITC	anti-CD8-AK-PE

2.2.3.3.2. Untersuchung im Durchflußzytometer

Verwendet wurde das Gerät Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) und das Software-Programm Cell Quest 1.1.1. mit der Macintosh Quadra 650 Hardware. Dieses Gerät wurde vom Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurden alle mononukleären Zellen aufgrund ihrer Größe (x-Achse) und Granularität (y-Achse) im Streudiagramm aufgetrennt und der Bereich mit der Lymphozytenpopulation durch das Setzen eines Gates markiert. Die innerhalb des Gates befindlichen Lymphozyten wurden aufgrund ihrer FITC- und PE-Fluoreszenz aufgetrennt. Einheitlich fluoreszierende Zellen wurden als Wolken dargestellt, die in einem Diagramm in x- und y-Richtung getrennt waren. Die Trennung wurde durch Quadrantenlinien verdeutlicht, die je nach Ausdehnung der Wolken so verschoben wurden, dass sich möglichst alle Punkte einer Wolke in einem Quadranten befanden. Diese Darstellungsweise wird als Dot-Plot bezeichnet. Im Dot-Plot aus Röhrchen 3 befanden sich im oberen rechten Quadranten die doppeltmarkierten CD4⁺-Zellen (CD4-Rezeptoren PE-markiert, CD3-Rezeptoren FITC-markiert), die den übrigen T-Zellen (CD3-Rezeptoren FITC-markiert) gegenübergestellt wurden (Abb. 10). Dementsprechend befanden sich im Dot-Plot aus Probe Nr. 4 die doppeltmarkierten CD8⁺-Zellen (CD8-

Rezeptoren PE-markiert, CD3-Rezeptoren FITC-markiert) im oberen rechten Quadranten (Abb. 11). Im Dot-Plot aus Probe Nr. 5 wurden im unteren rechten Quadranten die einfachmarkierten $CD4^+$ -Zellen (CD4-Rezeptoren FITC-markiert) und im oberen linken Quadranten die einfachmarkierten $CD8^+$ -Zellen (CD8-Rezeptoren PE-markiert) dargestellt (Abb. 12).

2.2.3.3.3. Berechnung der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen

Aus Röhrchen Nr. 3 und 5 wurde durch das Computerprogramm jeweils der prozentuale Anteil der $CD4^+$ -Zellen an den gemessenen Lymphozyten ermittelt. Aus beiden Werten wurde der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe der absoluten Lymphozytenzahl der Probe, die bei der Messung der hämatologischen Parameter bestimmt worden war, wurde rechnerisch die absolute Anzahl der $CD4^+$ -Zellen ermittelt. In Röhrchen Nr. 4 und 5 wurde jeweils der prozentuale Anteil der $CD8^+$ -Zellen bestimmt, und aus beiden Werten der Mittelwert gebildet. Auch hier wurde rechnerisch die absolute Anzahl der $CD8^+$ -Zellen bestimmt. Das Verhältnis der relativen $CD4^+$ -Zellen zu den relativen $CD8^+$ -Zellen bildete den $CD4/CD8$ -Quotienten.

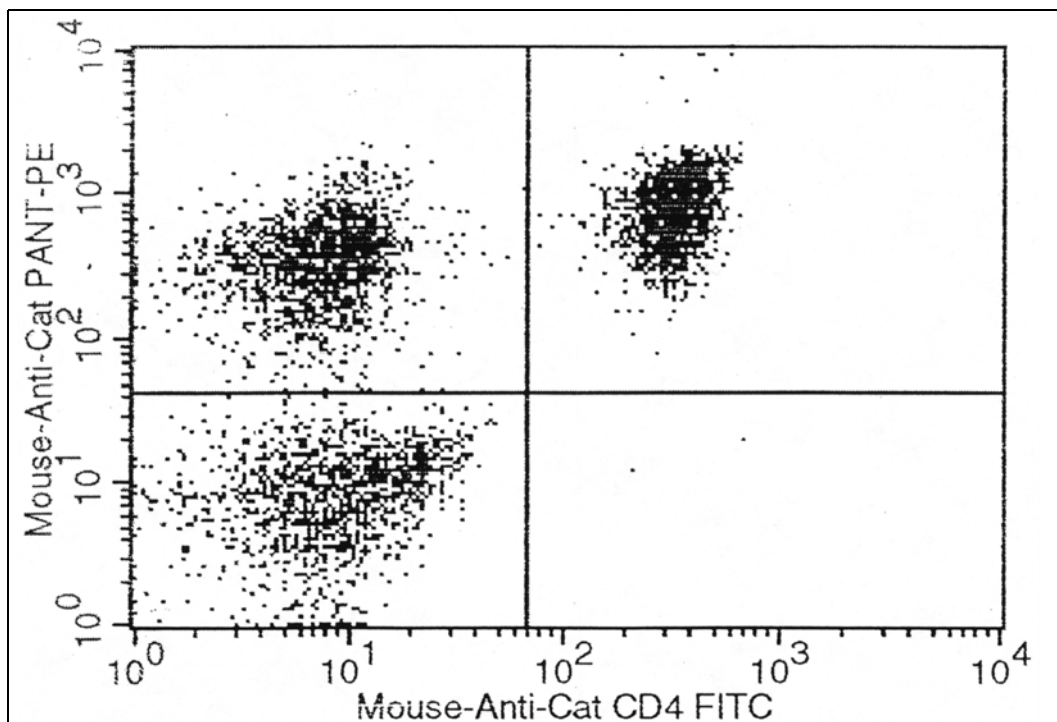


Abb. 10: Doppeltmarkierte $CD4^+$ -Zellen im rechten oberen Quadranten (Darstellung im Dot-Plot)

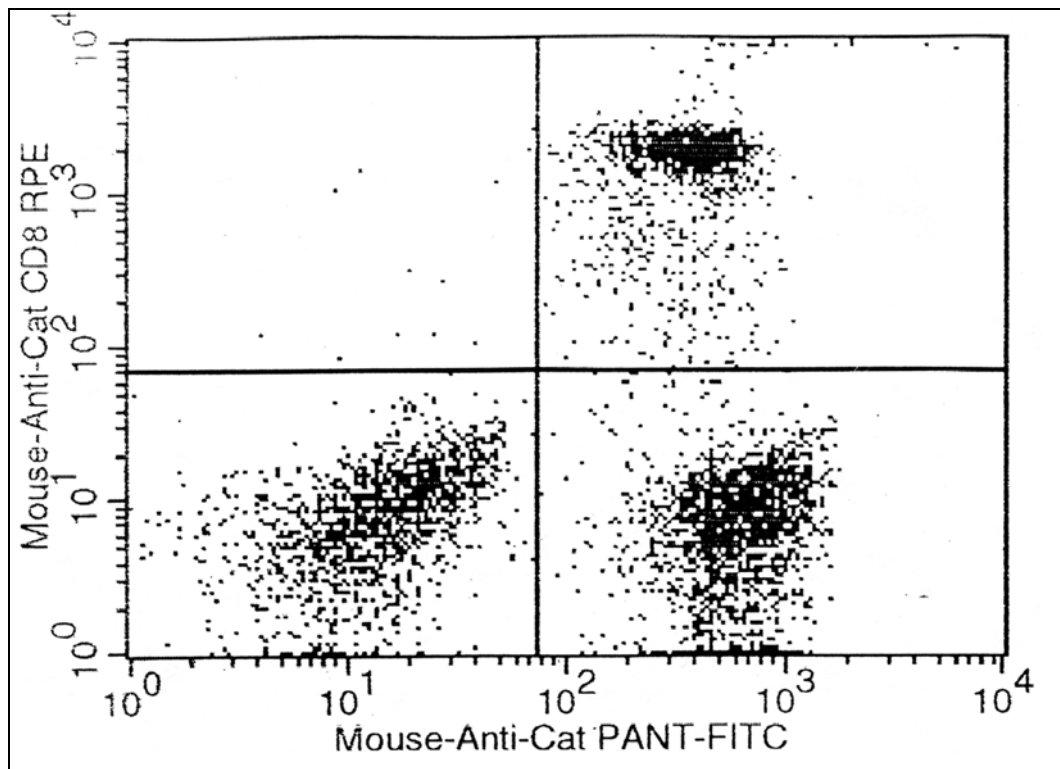


Abb. 11: Doppeltmarkierte $CD8^+$ -Zellen im rechten oberen Quadranten (Darstellung im Dot-Plot)

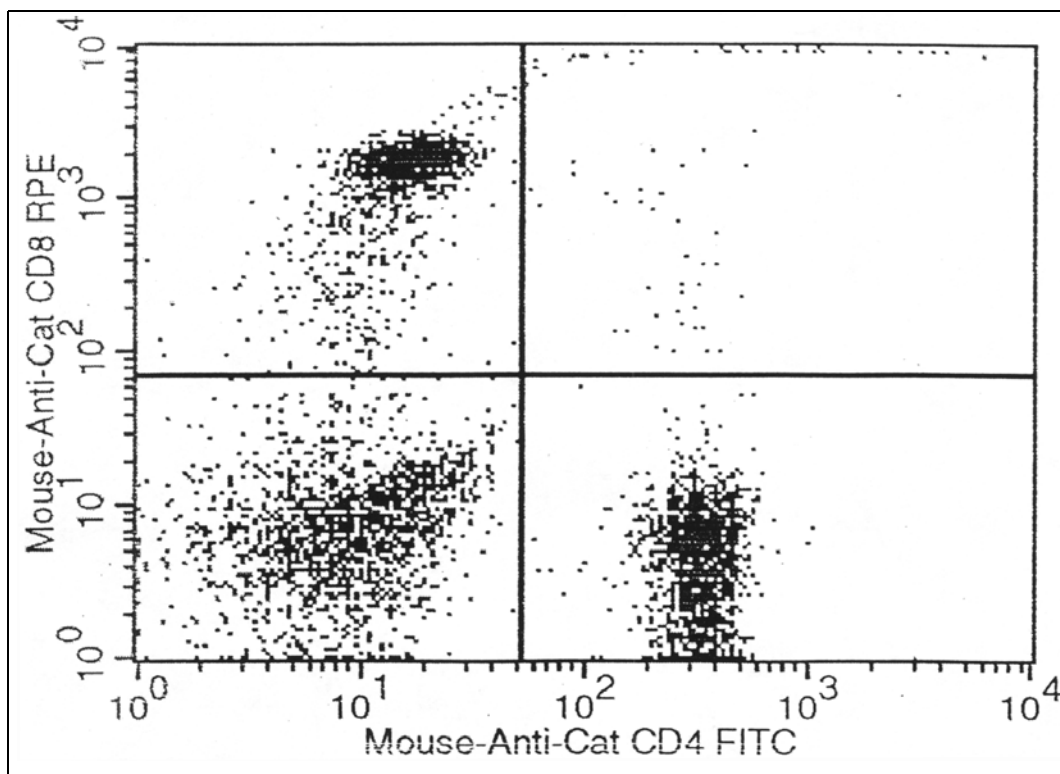


Abb. 12: Einfachmarkierte $CD4^+$ -Zellen im rechten unteren und einfach markierte $CD8^+$ -Zellen im linken oberen Quadranten (Darstellung im Dot-Plot)

2.2.3.4. Virologische Parameter

Zur quantitativen Bestimmung des Provirus- und der Virus-Loads wurde mittels des TaqMan-Verfahrens eine real-time Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Diese Bestimmung der Virus-DNA bzw. -RNA fand im Labor von Dr. Dieter Klein statt.

2.2.3.4.1. Probenvorbereitung

Zum Nachweis von Provirus wurde zunächst die DNA aus Vollblut isoliert und dann bei -20 °C gelagert. Für den Nachweis von Virus-RNA wurde bei -70 °C tiefgefrorenes Plasma verwendet. Diese DNA- bzw. RNA-Proben wurden gesammelt und alle drei Monate auf Trockeneis an Dr. Dieter Klein, Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien geschickt.

Die DNA wurde aus Vollblut an Tag 0 und nach zwei, vier und sechs Wochen unter Verwendung des QIAamp® Blood Kit (Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Reinigung wurde in drei Schritten durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde ein Lysat angefertigt. Dazu wurde das Blut auf Raumtemperatur erwärmt, je 200 µl jeder Probe in ein 1,5-ml-Eppendorfröhrchen pipettiert, 25 µl Qiagen-Protease und ein Lösepuffer hinzugefügt, gründlich gemischt (Vortex Genie®, Benda und Hobein AG, Zürich, Schweiz) und dann bei 70 °C zehn Minuten im Wasserbad inkubiert. Zur Lyse von Proteinen und anderen Kontaminationen, welche die PCR stören könnten, wurden in jedes Röhrchen 210 µl Ethanol (96 - 100 %) pipettiert, gemischt und weitere zwei Minuten inkubiert.

Der zweite Schritt bestand in der Isolierung der DNA. In ein offenes Auffangröhrchen wurde ein trichterförmiges, mit einem speziellen Filter (QIAamp®-Membran) über dem Auslauf ausgestattetes Probenröhrchen eingesetzt und in dieses das Lysat aus Schritt 1 überführt. Die beiden ineinandergesetzten Röhrchen wurden bei 4000 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war die DNA an die QIAamp®-Membran gebunden, während die anderen Substanzen mit dem Auffangröhrchen verworfen wurden.

Im dritten Schritt erfolgte eine zweimalige Reinigung, um Restkontaminationen aus der QIAamp®-Membran zu lösen. Das QIAamp®-Membran-Röhrchen wurde in ein neues Auffangröhrchen eingesetzt, 500 µl eines Waschpuffers hinzupipettiert, zentrifugiert und das Filtrat anschließend verworfen. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt.

Das, die gereinigte, gebundene DNA enthaltende QIAamp[®]-Membran-Röhrchen wurde nun in ein 1,5-ml-Eppendorfröhrchen verbracht. Zur Lösung der DNA wurden 200 µl eines Elutionspuffers zugegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation lag die DNA im Elutionspuffer gelöst vor (Abb. 13). Die so gewonnenen DNA-Proben wurden bis zum Versand bei -20 °C gelagert.

Zur Gewinnung der RNA wurde Vollblut in ein separates 3-ml-EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und dieses umgehend geschlossen und gekühlt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4000 U/min wurde das Plasma, zur Vermeidung von Kontaminationen, unter dem Abzug in hitzesterilisierte Eppendorf-Röhrchen pipettiert und sofort bei -70 °C tiefgefroren. Im Labor von Dr. Dieter Klein wurden die Plasmaproben bei -70 °C bis zur Verarbeitung gelagert und direkt vor der Isolierung im Wasserbad aufgetaut. Aus jeweils 140 µl aufgetauten Plasmas wurde die RNA mittels QIAamp Viral Kit (Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert.

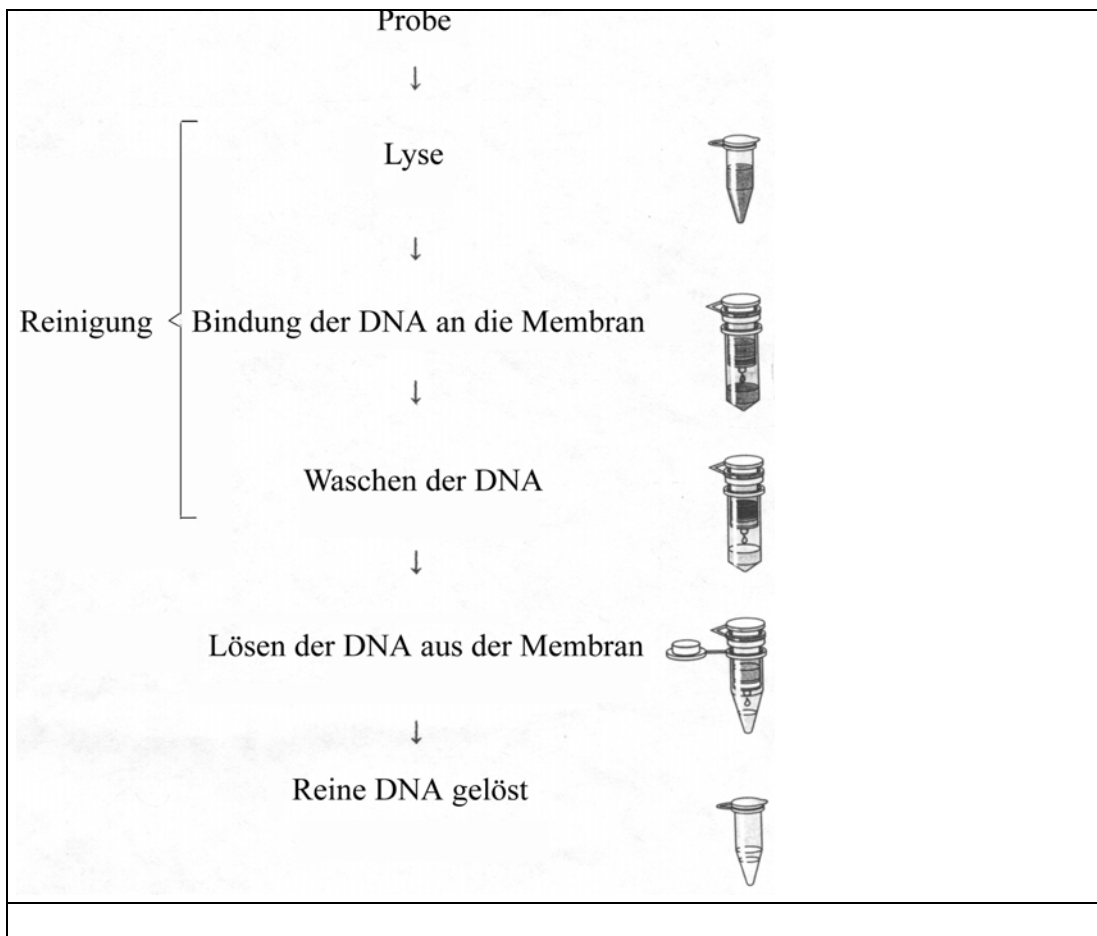


Abb. 13: Prinzip des QIAamp[®]-Membran-Verfahren

2.2.3.4.2. Prinzip der „real-time“ Polymerasekettenreaktion

Um den Gehalt an Provirus und Virus in den Proben zu bestimmen, wurde eine quantitative „real-time“-PCR (TaqMan-Verfahren) durchgeführt (KLEIN et al., 1999). Bei der verwendeten PCR erfolgte eine Amplifizierung von *gag*-Sequenzen des FIV.

HOLLAND und Mitarbeiter (1991) beschrieben den Mechanismus des TaqMan-Verfahrens. Die Quantifizierung einer Ausgangsmenge an DNA oder RNA ist mittels der ‚herkömmlichen‘ PCR nur in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion möglich. Bei der real-time-PCR kann die exponentielle Phase für jede Reaktion individuell ermittelt werden, wodurch eine quantitative Bestimmung der DNA- oder RNA-Menge relativ einfach möglich ist. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht weiterhin darin, dass die Messung und Quantifizierung am Ende der PCR-Reaktion abgeschlossen ist und die Reaktionsgefäße (PCR-Tube) nicht mehr geöffnet werden müssen. Es entfällt die arbeitsaufwendige Gel-Auftrennung der PCR-Produkte und das Risiko der Kontamination.

Bei der real-time-PCR befindet sich zusätzlich zu den beiden Primern, einem Vorwärts- und einem Rückwärts-gerichteten Primer, eine fluoreszenzmarkierte Sonde im PCR-Tube, die an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet. An die Sonde sind am 5'- und 3'-Ende zwei verschiedene fluoreszierende Farbstoffe gebunden, der Reporter- und der Quencherfarbstoff. Befinden sich beide Fluoreszenzfarbstoffe in räumlicher Nähe, kommt es bei Anregung durch einen Argonlaser zu einem Energietransfer. Die Energie vom Reporter wird auf den Quencher übertragen und dieser emittiert messbare Mengen Fluoreszenzlicht. Im Verlauf der Amplifizierung werden beide Primer mittels der Taq-Polymerase so lange verlängert, bis sie auf die Sonde treffen. Die Sonde wird durch die Aktivität der Taq-Polymerase vom DNA-Strang gelöst und gespalten. Reporter und Quencher werden getrennt und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden (Abb. 14). Das führt zu einem messbaren Anstieg der Reporterfluoreszenz. In einer positiven Reaktion ist die Fluoreszenzintensität des Reporters proportional zur Menge des gebildeten Amplifikationsproduktes. Die Fluoreszenzintensitäten der für Reporter und Quencher charakteristischen Wellenlängen werden im Verlauf der PCR von einer speziellen Kamera (CCD-Kamera) alle sieben Sekunden gemessen und gespeichert. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität wird graphisch dargestellt.

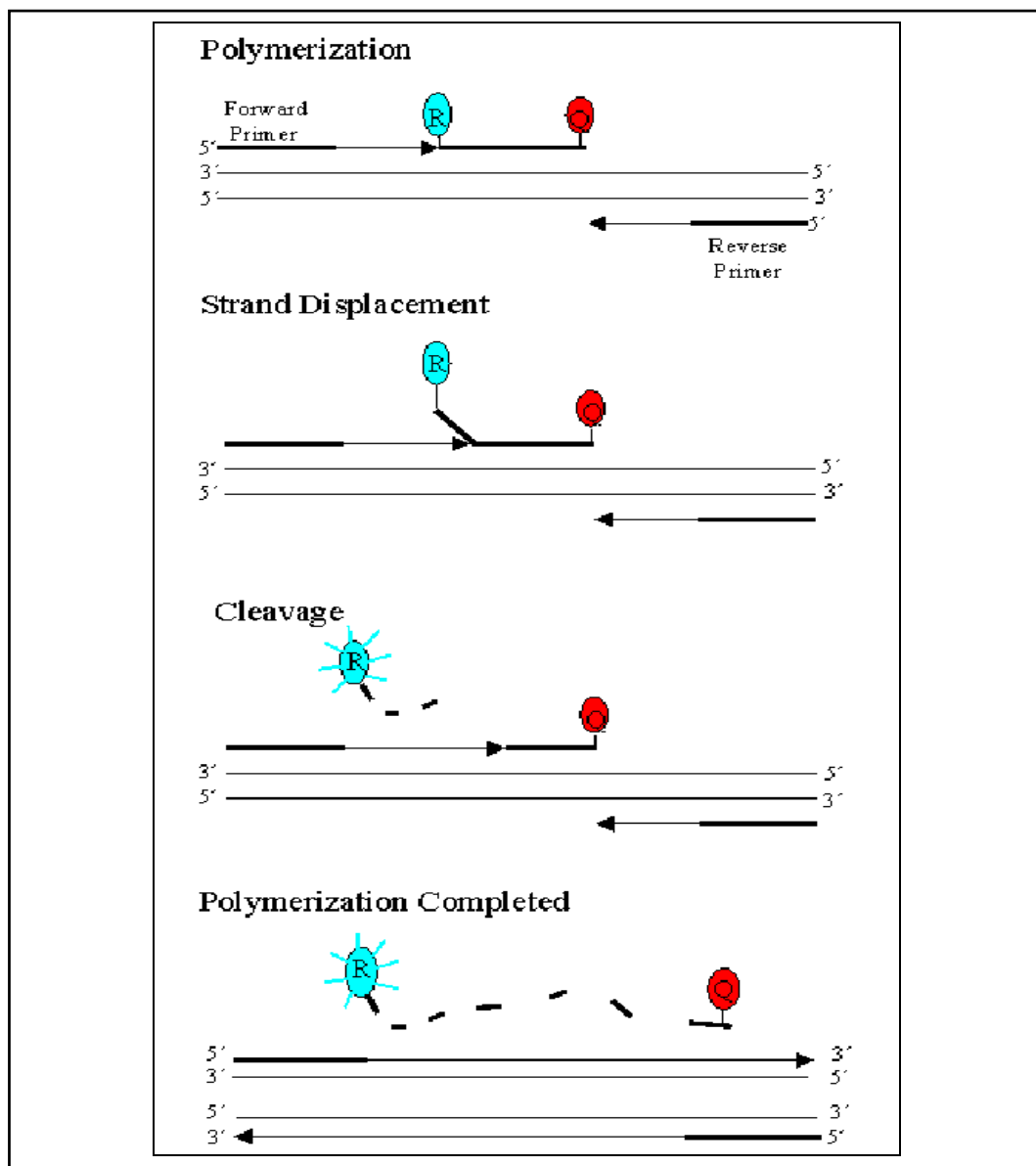


Abb. 14: Schematische Darstellung der Trennung von Quencher und Reporter durch die Taq-Polymerase

2.2.3.4.3. Primer und Sonden

Es wurden Primer- und Sonden-Sequenzen der Firma Perkin Elmer (Foster City, CA, USA) verwendet. Das Reaktionsgemisch enthielt den Vorwärts-Primer FIV0771f und den Rückwärts-Primer FIV1081r. Da die Virusisolate der natürlich infizierten Katzen in der Sonden-Bindungsregion deutliche Sequenzunterschiede aufwiesen, wurden drei verschiedene Sonden, FIV1010p, FIV1416p und FIV1372p eingesetzt. Wenn eine Probe mit einer Sonde nicht reagierte, wurde diese Probe erneut mit den anderen Sonden gemessen und anschließend die Sonde verwendet, die am besten band. Die Fluorochrome FAM (6-Carboxy-Fluoreszein)

am 5'-Ende und TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) am 3'-Ende der Sonden dienten als Reporter beziehungsweise Quencher. Um eine mögliche Verlängerung der Sonden durch die Taq-Polymerase zu vermeiden, waren diese am 3'-Ende blockiert.

Das PCR-Reaktionsgemisch wurde jeweils für 20 Bestimmungen angesetzt und bestand aus einer Pufferlösung (10 mM Tris), Kaliumchlorid (50 mM KCl), Magnesiumchlorid (3 mM MgCl₂), den Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 200 nM), beiden Primern (je 300 nM) und 2,5 U der Taq-DNA-Polymerase und je einer Sonde (200 nM). Für die Bestimmung der RNA-Menge im Plasma musste die RNA zunächst in DNA umgeschrieben werden. Aus diesem Grund enthielt das Reaktionsgemisch für die Messung des Virus-Loads zusätzlich 2,5 U AMV Reverse Transkriptase.

2.2.3.4.4. Auswertung der Fluoreszenzsignale

Da bei der real-time-PCR die einzelnen Reaktionsbestandteile nur in sehr geringer Menge in den Tubes vorhanden sind, können Pipettierfehler eine deutliche Veränderung der Ergebnisse verursachen. Um den Einfluß dieser Fehlerquelle zu minimieren, wurde in jedem Amplifikationszyklus der Quotient aus der Reporter- und Quencher-Fluoreszenzintensität gebildet. Dieser Quotient entsprach dem normalisierten Reportersignal (R_n) zu jedem Zyklus, von dem der R_n -Wert zu Beginn der PCR abgezogen wurde. Daraus ergab sich der ΔR_n -Wert, der die Reporterfluoreszenz-Änderung unabhängig von der anfangs eingesetzten Sondenkonzentration wiedergab. Die Reporterfluoreszenz war in den ersten PCR-Zyklen nicht ausreichend, um von der CCD-Kamera aufgenommen zu werden, nahm jedoch nach einigen Zyklen zu. Der Verlauf der Zunahme wurde gemessen. Die normalisierte Änderung der Reporterfluoreszenz war proportional zur Menge an DNA oder RNA, die während der PCR gebildet worden war und wurde in einem ‚Amplification Plot‘ dargestellt (Abb. 15).

$$\Delta R_n = \frac{\text{Fluoreszenzintensität R (Zyklus 1 – 40)}}{\text{Fluoreszenzintensität Q (Zyklus 1 – 40)}} - \frac{\text{Fluoreszenzintensität R (Beginn)}}{\text{Fluoreszenzintensität R (Beginn)}}$$

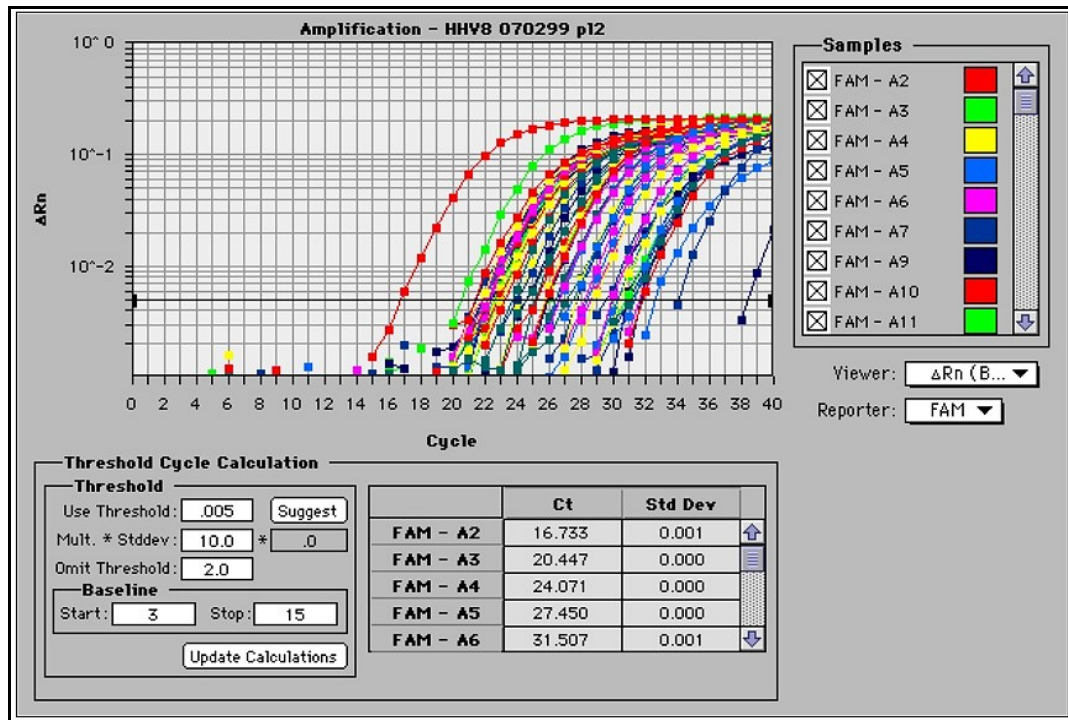


Abb. 15: „Amplification Plot“

Innerhalb dieser Verlaufskurve mußte nun ein geeigneter Parameter bestimmt werden, der eine Quantifizierung der DNA- oder RNA-Ausgangsmenge erlaubte. Dazu wurde der sogenannte ‚Treshold‘ festgelegt. Die am Beginn der PCR gemessenen Reportersignale stellten das Grundrauschen der PCR dar, das auch bei negativen Proben messbar war. Aus den Werten dieses Grundrauschens wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Der Treshold wurde dann bei der zehnfachen Standardabweichung des Mittelwertes festgesetzt. Dadurch wurde sichergestellt, dass bei einer negativen Probe die PCR-Kurve den Treshold nicht schneidet und als falsch-positiv gewertet wurde.

Als ‚Treshold cycle‘ (C_T -Wert) wird der Wert bezeichnet, bei dem die PCR-Verlaufskurve den Treshold schneidet. Die C_T -Werte bekannter Verdünnungsstufen wurden logarithmisch gegen die eingesetzte DNA- oder RNA-Menge aufgetragen. Daraus ergab sich eine Standardkurve, mit einem hohen Korrelationskoeffizient. Mit Hilfe der Standardkurve konnte ausgehend von einem gemessenen C_T -Wert einer unbekannten Probe deren Ausgangs-DNA oder -RNA-Menge abgelesen werden.

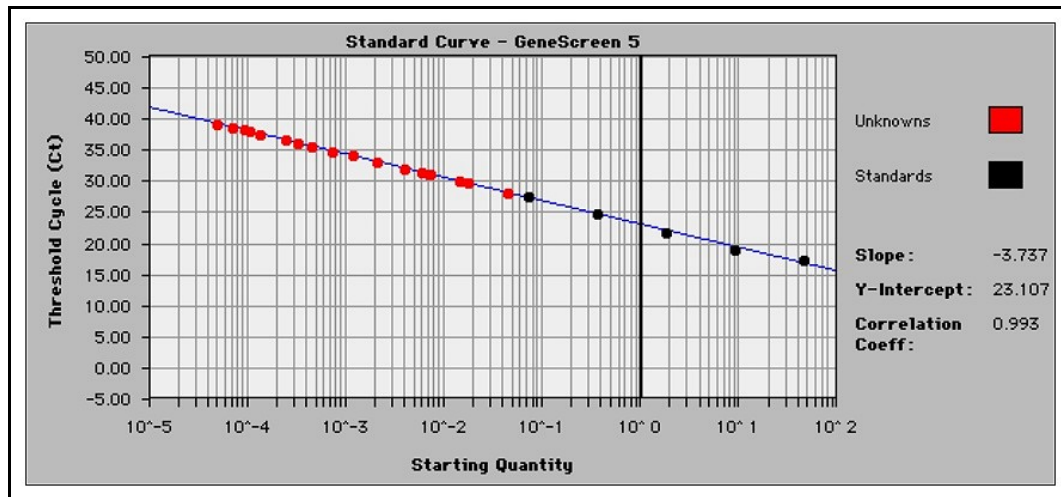


Abb.16: Standardkurve, die nach den schwarz dargestellten Standardwerten erstellt wurde, rot dargestellt sind die Messwerte

2.3.4. Untersuchungen zur Resistenzentwicklung

Zusätzlich zur Kontrolle des Therapieerfolges und eventueller Nebenwirkungen wurden Untersuchungen zur Resistenzentwicklung gegen AMD3100 durchgeführt. Dazu wurde in Zellkultur die Hemmung der Virusreplikation anhand der Menge an gebildetem p24-Antigen gemessen.

2.3.4.1. Probengewinnung

Für die *in-vitro*-Versuche wurden von jedem Tier vor Therapiebeginn und nach 6 Wochen je 1 ml EDTA-Vollblut gewonnen. Die Proben wurden am Tag der Blutentnahme per Express an Dr. H. Egberink, Institut für Virologie der Universität Utrecht, Niederlande, geschickt und dort sofort weiterverarbeitet. Da die Herstellung von Viruskulturen sehr aufwendig ist, wurden nur aus den Blutproben der Katzen Kulturen angelegt, die mit AMD3100 behandelt wurden.

2.3.4.2. Herstellen der Lymphozytenkulturen

Zur Herstellung einer primären Lymphozyten-Zellkultur wurden aus dem Katzenblut Lymphozyten isoliert. Zur Gewinnung der Lymphozyten wurde das Blut bei 500 U/min zehn Minuten lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in 10 ml PBS suspendiert und vorsichtig über 2,5 ml Ficoll gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 30 Minuten bei 1000 U/min. Im entstandenen weißen Zellsaum waren nun vorwiegend periphere mononukleäre

Blutzellen (PBMC) enthalten. Der Saum wurde vorsichtig abpipettiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS suspendiert. Die PBMC wurden in einer Zählkammer gezählt und anschließend durch Zugabe von PBS auf eine Dichte von 10^6 Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, bei 37 °C in einer CO₂-kontrollierten Umgebung kultiviert. Dem Medium waren 10 % fetales Kälberserum, rekombinantes IL-2 in einer Konzentration von 100 IU/ml und 2,5 µg/ml Concanavalin A zugesetzt worden. Nach einer Woche wurden die Zellen 1:2 geteilt, mit neuem Medium versetzt und wieder kultiviert. Der Nachweis des viralen Kapsidproteins p24 im Überstand der Zellkultur erfolgte mittels ELISA (Durchführung des ELISA siehe HARTMANN, 1995).

2.3.4.3. Hemmung der Virusreplikation *in vitro*

Um die Hemmung der Virusreplikation nachzuweisen, wurden die Zellkulturen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen AMD3100 kultiviert. Die Replikationsrate der Viren wurde anhand der Menge des gebildeten p24-Antigens bestimmt. Die Messung des p24-Antigens erfolgte mit oben beschriebenen ELISA. Gemessen wurde die in ng/ml (Konzentration von AMD3100 in der Zellkultur, bei der 50 % der Virusreplikation unterdrückt wurde) an Tag 0 und am Ende der Studie. Die beiden EC₅₀-Werte wurden miteinander verglichen, um eine Veränderung der Empfindlichkeit der FIV-Viren gegen AMD3100 durch die Therapie zu ermitteln. Eine Resistenzbildung würde sich durch eine deutlich höhere EC₅₀ am Ende der Therapie im Vergleich zum Therapiebeginn zeigen.

2.3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Datenverarbeitungsprogramm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte entsprechend der Einteilung der Katzen in die vier Behandlungsgruppen. In jeder Gruppe wurde die Veränderung im Therapiezeitraum ermittelt, indem für jeden Parameter die Differenz zwischen den End- und den Anfangsmittelwerten errechnet wurde. Mittels Kruskal-Wallis-Test wurden die Unterschiede der Veränderungen durch Einzelvergleich der Gruppen statistisch ausgewertet. Unterschiede galten als statistisch signifikant, wenn das Testniveau von $p = 0,05$ erreicht oder unterschritten wurde.

IV. Ergebnisse

1. Prävalenz der FIV-Infektion

Im Zeitraum von Januar 1998 bis Mai 2000 wurden 3611 Katzenseren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das feline Immunschwächevirus (FIV) getestet. Bei 83 Katzen (2,3 %) wurden Antikörper gegen FIV nachgewiesen (Tab. 14).

Tab. 14: Prävalenz der FIV-Infektion in absoluten Zahlen und in Prozent

	FIV-getestete Seren	FIV-positive Seren
Anzahl	3611	83
Prozent	100 %	2,3 %

2. Voruntersuchung

Über einen Zeitraum von jeweils 24 Stunden wurden bei zwei FIV-infizierten Katzen Voruntersuchungen durchgeführt. Diese beinhalteten EKG-Messungen und die Ermittlung der Serumkonzentrationen von Kalzium und Magnesium. Bei den beiden Katzen konnten weder Herzrhythmusstörungen noch andere Veränderungen im Verlauf der EKG-Untersuchungen festgestellt werden. Unterschiede im EKG zeigten sich weder beim Vergleich zwischen der Dosierung von 0,5 mg/kg zu 1 mg/kg noch im Vergleich der intravenösen zur subkutanen Medikamentenapplikation.

Im Untersuchungszeitraum fielen die Serumwerte von Kalzium und Magnesium geringgradig, stiegen dann aber wieder. Der Abfall des Kalziums wurde zeitlich vor dem des Magnesiums beobachtet, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Alle Werte lagen immer innerhalb des Referenzbereiches (Tab. 15 und 16). Beide Tiere waren im Untersuchungszeitraum bei gutem Allgemeinbefinden, es wurden klinisch keine Nebenwirkungen von AMD3100 festgestellt. Auch die Messung der Blut- und Serumwerte zeigte keine auffälligen Befunde, alle gemessenen Werte lagen bei beiden Katzen im Referenzbereich.

Tab. 15: Änderungen der Serumwerte von Kalzium und Magnesium (in mmol/l) über 24 Stunden nach einmaliger Applikation von AMD3100 in einer Dosierung von 0,5 mg/kg subkutan (sc.) oder intravenös (iv.)

Zeitpunkt	AMD3100 0,5 mg/kg sc.		AMD3100 0,5 mg/kg iv.	
	Kalzium	Magnesium	Kalzium	Magnesium
Beginn	2,53	0,88	2,43	0,90
5 Minuten	2,37	0,82	2,38	0,84
15 Minuten	2,29	0,81	2,37	0,84
30 Minuten	2,36	0,81	2,35	0,82
60 Minuten	2,45	0,75	2,34	0,77
120 Minuten	2,48	0,68	2,39	0,75
6 Stunden	2,49	0,84	2,44	0,75
12 Stunden	2,53	0,83	2,16	0,74
24 Stunden	2,40	0,78	2,45	0,85

Tab. 16: Änderungen der Serumwerte von Kalzium und Magnesium (in mmol/l) über 24 Stunden nach einmaliger Applikation von AMD3100 in einer Dosierung von 1 mg/kg subkutan (sc.) oder intravenös (iv.)

Zeitpunkt	AMD3100 1 mg/kg sc.		AMD3100 1 mg/kg iv.	
	Kalzium	Magnesium	Kalzium	Magnesium
Beginn	2,44	0,84	2,53	0,86
5 Minuten	2,39	0,84	2,49	0,81
15 Minuten	2,37	0,81	2,47	0,80
30 Minuten	2,33	0,80	2,45	0,76
60 Minuten	2,39	0,71	2,39	0,79
120 Minuten	2,40	0,72	2,40	0,75
6 Stunden	2,51	0,78	2,42	0,71
12 Stunden	2,47	0,81	2,46	0,84
24 Stunden	2,42	0,88	2,52	0,80

3. Therapiestudie

Die Änderungen der klinischen, labordiagnostischen, immunologischen und virologischen Parameter der einzelnen Gruppen wurden statistisch miteinander verglichen. Nur statistisch signifikante Unterschiede wurden graphisch dargestellt.

3.1. Klinische Parameter

Zu den klinischen Parametern zählten die Körpermasse, der Karnofsky-Index und die klinischen Veränderungen, von denen nur Entzündungen der Maulhöhle und Konjunktivitiden ausgewertet wurden.

3.1.1. Körpermasse

Im Verlauf der Therapie veränderte sich die Körpermasse der Katzen in den vier Behandlungsgruppen nur geringfügig. Ein Vergleich der Mittelwerte der Körpermasse zu Therapiebeginn und -ende zeigte bei den Katzen der AMD- und denen der AMD/PMEA-Gruppe lediglich eine Zunahme um 0,1 kg. Bei den Tieren der PMEA-Gruppe kam es zu einer Gewichtszunahme um durchschnittlich 0,2 kg, während die Tiere der Placebo-Gruppe im Mittel am Ende der Therapie 0,1 kg weniger wogen (Tab. 17). Die Änderung der Körpermasse zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen untereinander im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 18).

Tab. 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Körpermasse (in kg) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	5,3	5,0	5,0	4,7
	Standardabweichung	1,8	1,4	1,3	1,3
2	Mittelwert	5,2	5,0	5,0	4,7
	Standardabweichung	1,8	1,4	1,3	1,2
4	Mittelwert	5,2	5,1	5,1	4,8
	Standardabweichung	1,7	1,3	1,2	1,2
6	Mittelwert	5,2	5,1	5,2	4,8
	Standardabweichung	1,7	1,3	1,2	1,2

Tab. 18: Durchschnittliche Änderung der Körpermasse (in kg) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	5,3	5,0	5,0	4,7
Endwert	5,2	5,1	5,2	4,8
Veränderung	-0,1	0,1	0,2	0,1

3.1.2. Karnofsky-Index

Der Karnofsky-Index nahm bei den Katzen aller vier Gruppen im Verlauf der Therapie im Durchschnitt zu. Bei den Katzen der AMD-Gruppe stieg er um 3,6 %, bei denen der AMD/PMEA-Gruppe um 7,3 % und bei denen der PMEA-Gruppe um 6,4 %. In der Placebogruppe zeigten die Tiere eine durchschnittliche Verbesserung um 4,4 % (Tab. 19). Die Änderung des Karnofsky-Index zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen untereinander im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 20).

Tab. 19: Mittelwerte und Standardabweichungen des Karnofsky-Index (in %) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	83,1	93,4	81,4	85,9
	Standardabweichung	17,5	4,1	13,3	16,8
2	Mittelwert	84,6	95,9	85,5	89,4
	Standardabweichung	17,3	1,9	11,6	13,2
4	Mittelwert	86,1	96,7	87,3	93,0
	Standardabweichung	16,3	2,1	11,1	10,6
6	Mittelwert	87,5	97,0	87,8	93,2
	Standardabweichung	14,9	1,4	11,3	10,7

Tab. 20: Durchschnittliche Änderung des Karnofsky-Index (in %) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	83,1	93,4	81,4	85,9
Endwert	87,5	97,0	87,8	93,2
Veränderung	4,4	3,6	6,4	7,3

3.1.3. Entzündungen der Maulhöhle

Zu Beginn und im Verlauf der Therapie litten alle 40 Katzen an Entzündungen der Maulhöhle. Die Maulhöhlenentzündung der Katzen in der AMD-, AMD/PMEA- und PMEA-Gruppe wurde zu Beginn mit durchschnittlich 13,9, 20,2 bzw. 30,9 Graden beurteilt. In der Placebogruppe wurde sie mit 14,8 Graden bewertet. Eine Besserung der Maulhöhlenentzündung wurde bei allen Katzen festgestellt. In der PMEA- und der AMD/PMEA-Gruppe kam es zu einer durchschnittlichen Verbesserung um 17,1 bzw. 13,2 Grade (Abb. 17; Tab. 22 und 23). Die Änderung der Maulhöhlenentzündung zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der Placebo- und der PMEA- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe und zwischen der AMD- und der PMEA- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe (Tab. 21).

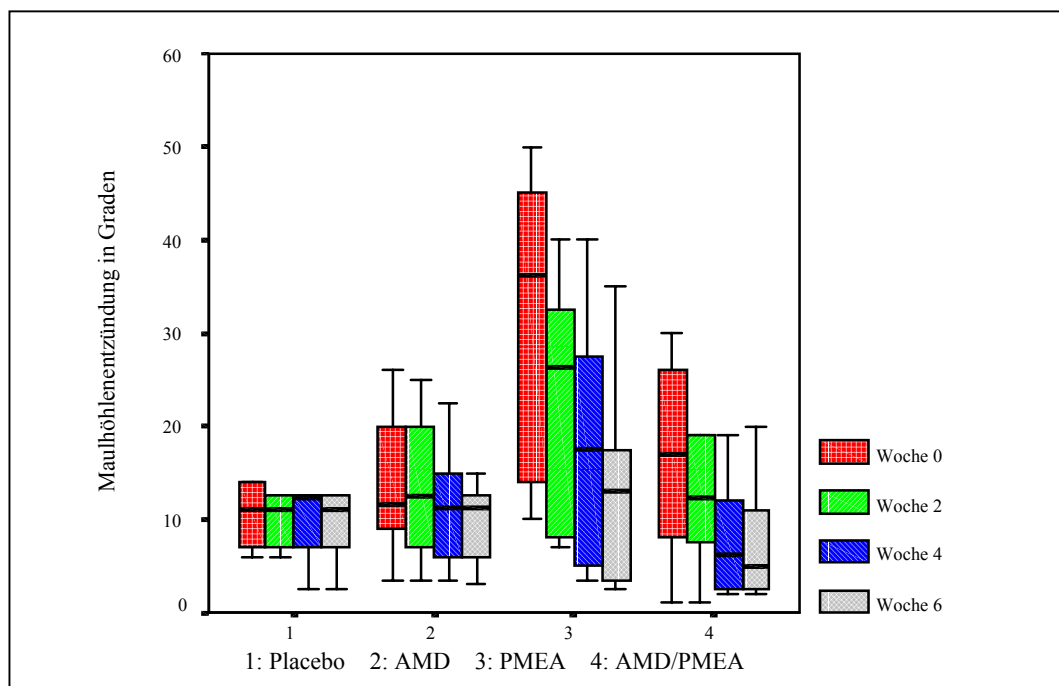


Abb. 17: Änderung der Maulhöhlenentzündung (in Graden) in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 21: Statistischer Vergleich der Unterschiede (p-Wert) der Maulhöhlenentzündung in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Placebo		0,187	< 0,001	0,010
AMD	0,187		< 0,001	0,020
PMEA	< 0,001	< 0,001		0,212
AMD/PMEA	0,010	0,020	0,212	

Tab. 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der Maulhöhlenentzündung (in Graden) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	14,8	13,9	30,9	20,2
	Standardabweichung	11,1	7,6	15,4	18,2
2	Mittelwert	14,1	13,3	23,0	14,9
	Standardabweichung	10,0	7,0	12,3	14,6
4	Mittelwert	13,8	11,3	17,8	10,1
	Standardabweichung	9,8	5,8	12,0	10,3
6	Mittelwert	12,7	10,8	13,8	7,0
	Standardabweichung	8,3	5,7	10,1	5,8

Tab. 23: Durchschnittliche Änderung der Maulhöhlenentzündung (in Graden) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	14,8	13,9	30,9	20,2
Endwert	12,7	10,8	13,8	7,0
Veränderung	-2,1	-3,1	-17,1	-13,2

3.1.4. Konjunktivitis

Bei 19 Katzen wurden gerötete Konjunktiven und Augenausfluss festgestellt. Fünf Tiere befanden sich in der AMD-, fünf in der AMD/PMEA-, fünf in der PMEA- und vier in der Placebogruppe. Die Konjunktivitis der Katzen in der AMD-, AMD/PMEA- und PMEA-Gruppe besserte sich durchschnittlich um 1,8; 0,9 bzw. 2,6 Grade. In der Placebogruppe wurde im Durchschnitt eine Besserung von 3,4 Graden erreicht. (Tab. 24). Die Änderung der Konjunktivitis zwischen

Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 25).

Tab. 24: Mittelwerte und Standardabweichungen der Konjunktivitis (in Graden) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	3,4	4,0	5,8	5,3
	Standardabweichung	6,4	6,7	9,3	7,8
2	Mittelwert	2,8	3,2	4,8	5,3
	Standardabweichung	5,3	4,8	9,2	7,8
4	Mittelwert	2,6	2,6	3,7	4,2
	Standardabweichung	5,0	4,1	7,7	6,7
6	Mittelwert	1,8	2,2	3,2	4,4
	Standardabweichung	3,8	3,2	6,1	6,7

Tab. 25: Durchschnittliche Änderung der Konjunktivitis (in Graden) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	3,4	4,0	5,8	5,3
Endwert	1,8	2,2	3,2	4,4
Veränderung	-1,6	-1,8	-2,6	-0,9

3.2. Labordiagnostische Parameter

Es wurden die Änderungen der hämatologischen und der klinisch-chemischen Laborparameter der einzelnen Gruppen untereinander mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen und statistisch signifikante Unterschiede graphisch dargestellt.

3.2.1. Hämatologische Parameter

Es erfolgte eine statistische Auswertung der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins und Hämatokrits und der Anzahl der Leukozyten, der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten.

3.2.1.1. Erythrozytenzahl

Bei den Tieren der Placebo- und der AMD-Gruppe kam es zu geringgradigen Veränderungen der Anzahl der Erythrozyten. Sie fiel in der Placebogruppe um

$0,28 \times 10^6/\mu\text{l}$ und stieg in der AMD-Gruppe um $0,12 \times 10^6/\mu\text{l}$. Dagegen zeigte sich in beiden, mit PMEA behandelten Gruppen ein deutlicher Abfall der Erythrozytenzahl. In der PMEA-Gruppe fielen sie um $2,85 \times 10^6/\mu\text{l}$ und in der AMD/PMEA-Gruppe um $2,96 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Abb. 18; Tab. 27 und 28). Die Änderung der Erythrozytenzahl zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der Placebo- und der PMEA- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe und zwischen der AMD- und der PMEA- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe (Tab. 26).

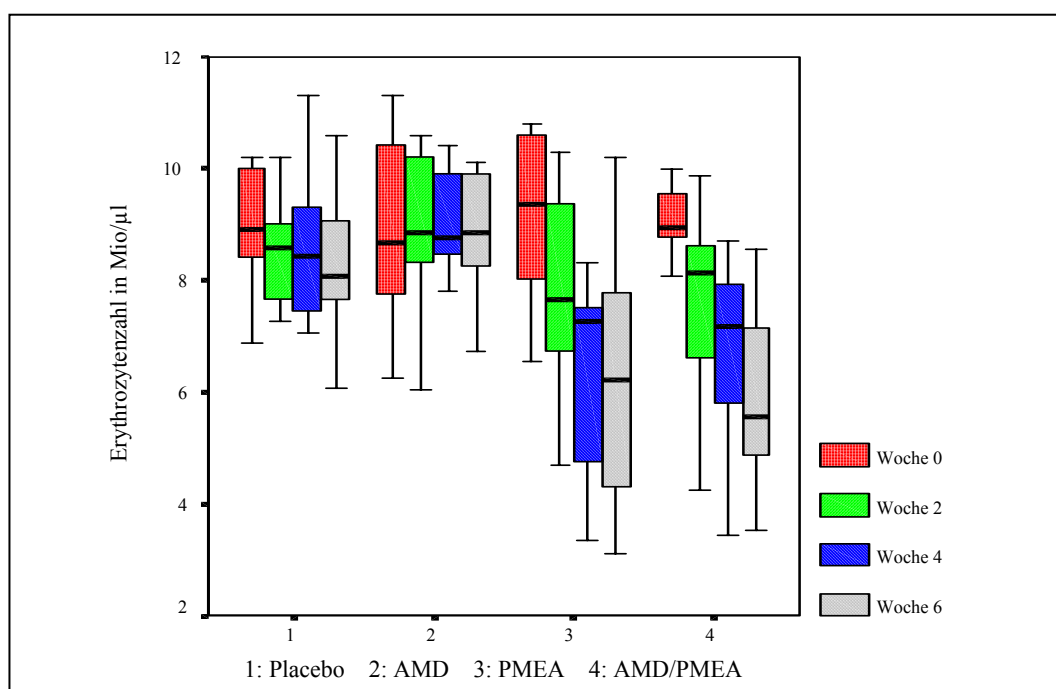


Abb. 18: Änderung der Erythrozytenzahl (in $10^6/\mu\text{l}$) in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 26: Statistischer Vergleich der Unterschiede (p-Wert) der Erythrozytenzahl in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Placebo		0,307	0,005	< 0,001
AMD	0,307		0,002	< 0,001
PMEA	0,005	0,002		0,880
AMD/PMEA	< 0,001	< 0,001	0,880	

Tab. 27: Mittelwerte und Standardabweichungen der Erythrozytenzahl (in $10^6/\mu\text{l}$) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	8,57	8,79	9,07	8,80
	Standardabweichung	1,69	1,66	1,60	1,23
2	Mittelwert	8,12	8,93	7,75	7,73
	Standardabweichung	1,72	1,34	1,71	1,59
4	Mittelwert	8,23	9,02	6,52	6,73
	Standardabweichung	1,93	1,69	1,67	1,55
6	Mittelwert	8,29	8,91	6,22	5,84
	Standardabweichung	2,07	1,05	2,16	1,58

Tab. 28: Durchschnittliche Änderung der Erythrozytenzahl (in $10^6/\mu\text{l}$) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	8,57	8,79	9,07	8,80
Endwert	8,29	8,91	6,22	5,84
Veränderung	-0,28	0,12	-2,85	-2,96

3.2.1.2. Hämoglobin

Im Therapieverlauf kam es in allen Gruppen zu einem durchschnittlichen Abfall des Hämoglobins, die Anfangswerte wurden in keiner Gruppe wieder erreicht. Bei den Katzen in der AMD-Gruppe fiel der Hämoglobinwert im Durchschnitt um 0,1 mmol/l, bei denen der Placebogruppe um 0,45 mmol/l. Am deutlichsten fielen die durchschnittlichen Hämoglobinwerte der Katzen in der PMEA- und der AMD/PMEA-Gruppe. Bei den Katzen der PMEA-Gruppe kam es zu einem Abfall um 1,84 mmol/l und bei den Katzen der AMD/PMEA-Gruppe fiel der Hämoglobinwert um 1,64 mmol/l (Abb. 19; Tab. 30 und 31). Die Änderung der Hämoglobinwerte zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der Placebo- und der PMEA-Gruppe und zwischen der AMD- und der PMEA- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe (Tab. 29).

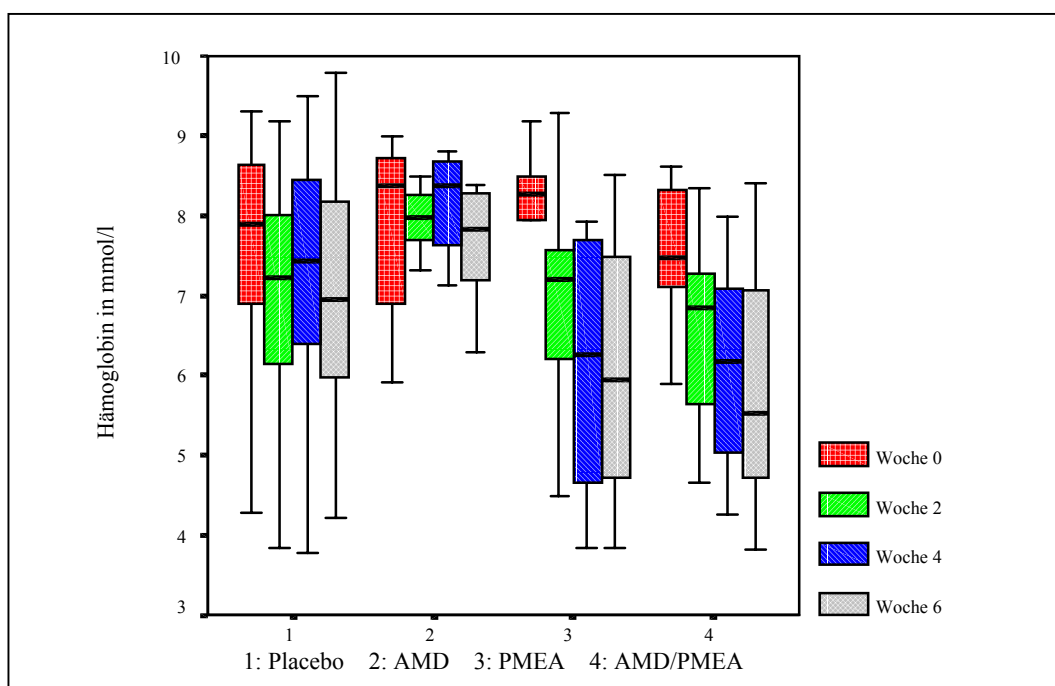


Abb. 19: Änderung der Hämoglobinwerte (in mmol/l) in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 29: Statistischer Vergleich der Unterschiede (p-Wert) der Hämoglobinwerte in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Placebo		0,199	0,023	0,082
AMD	0,199		0,003	0,034
PMEA	0,023	0,003		0,880
AMD/PMEA	0,082	0,034	0,880	

Tab. 30: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hämoglobinwerte (in mmol/l) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	7,42	7,77	7,96	7,48
	Standardabweichung	1,6	1,20	1,41	0,90
2	Mittelwert	7,02	7,77	6,88	6,61
	Standardabweichung	1,55	0,83	1,35	1,23
4	Mittelwert	7,18	7,93	6,24	6,08
	Standardabweichung	1,71	1,02	1,51	1,30
6	Mittelwert	6,97	7,67	6,12	5,84
	Standardabweichung	1,90	0,67	1,66	1,43

Tab. 31: Durchschnittliche Änderung der Hämoglobinwerte (in mmol/l) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	7,42	7,77	7,96	7,48
Endwert	6,97	7,67	6,12	5,84
Veränderung	-0,45	-0,1	-1,84	-1,64

3.2.1.3. Hämatokrit

Im Durchschnitt sanken die Hämatokritwerte aller Gruppen im Verlauf der Therapie, die Anfangswerte wurden nicht wieder erreicht. In der Placebogruppe kam es im Durchschnitt zu einem Abfall des Hämatokrits um 1,7 %, in der AMD-Gruppe um 0,5 %. Der Hämatokrit fiel in AMD/PMEA-Gruppe um 8,5 % und in der PMEA-Gruppe um 9,5 % ab (Abb. 20; Tab. 33 und 34). Die Änderung der Hämatokritwerte zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der Placebo- und der PMEA- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe und zwischen der AMD- und der PMEA- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe (Tab. 32).

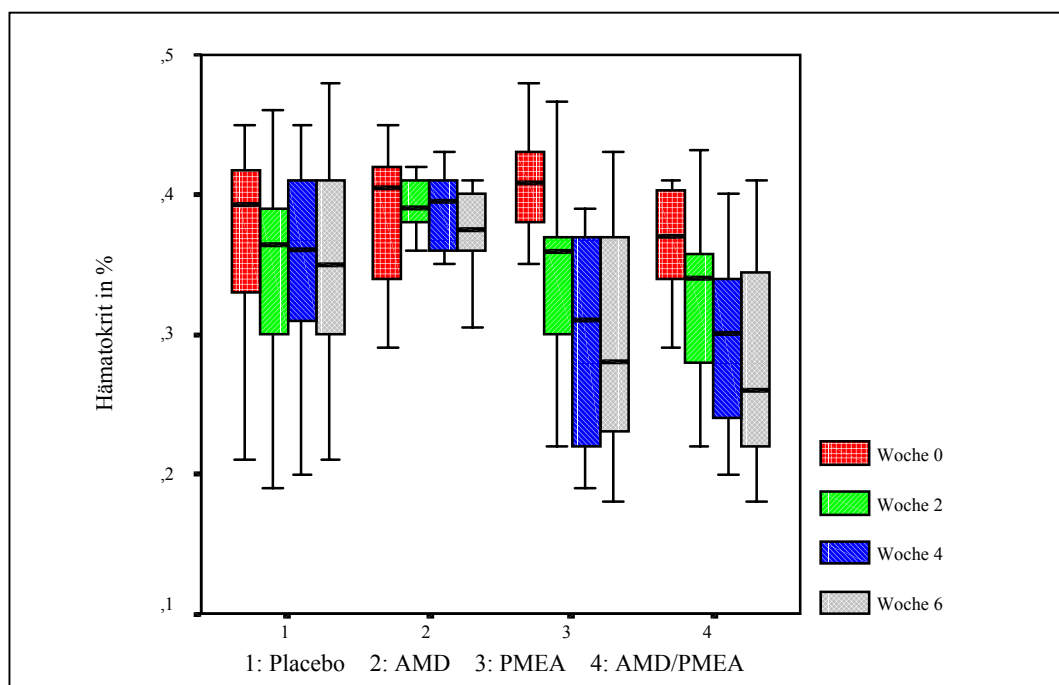


Abb. 20: Änderung des Hämatokrits (in %) in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 32: Statistischer Vergleich der Unterschiede (p-Wert) des Hämatokrits in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Placebo		0,649	0,004	0,049
AMD	0,649		0,003	0,028
PMEA	0,004	0,003		1,000
AMD/PMEA	0,049	0,028	1,000	

Tab. 33: Mittelwerte und Standardabweichungen des Hämatokrits (in %) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	36,6	38,2	39,5	36,4
	Standardabweichung	0,08	0,06	0,06	0,04
2	Mittelwert	34,8	37,8	33,8	31,3
	Standardabweichung	0,08	0,04	0,07	0,09
4	Mittelwert	34,9	38,0	30,0	29,5
	Standardabweichung	0,08	0,05	0,07	0,07
6	Mittelwert	34,9	37,7	30,0	27,9
	Standardabweichung	0,09	0,03	0,08	0,08

Tab. 34: Durchschnittliche Änderung des Hämatokrits (in %) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	36,6	38,2	39,5	36,4
Endwert	34,9	37,7	30,0	27,9
Veränderung	-1,7	-0,5	-9,5	-8,5

3.2.1.4. Leukozyten

Bei den Katzen der PMEA-Gruppe kam es während der Therapie zu einem Abfall der Leukozytenzahl um durchschnittlich 1698 Zellen/ μ l. In den anderen Gruppen wurde jeweils ein Ansteigen der Leukozytenzahl beobachtet. In der AMD-Gruppe zeigte sich ein durchschnittlicher Anstieg um 2646 Zellen/ μ l, in der AMD/PMEA-Gruppe um 1748 Zellen/ μ l und in der Placebogruppe um 1642 Zellen/ μ l (Tab. 35). Die Änderung der Leukozytenzahl zwischen Therapiebeginn und -ende

unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 36).

Tab. 35: Mittelwerte und Standardabweichungen der Leukozytenzahl (in Zellen/ μ l) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	7832	8941	9452	8435
	Standardabweichung	4559	4673	2730	6380
2	Mittelwert	9356	13426	8126	11216
	Standardabweichung	5709	7926	3897	5340
4	Mittelwert	8652	13425	8004	9034
	Standardabweichung	7205	7661	4424	4907
6	Mittelwert	9474	11587	7754	10183
	Standardabweichung	10257	6400	5055	5860

Tab. 36: Durchschnittliche Änderung der Leukozytenzahl (in Zellen/ μ l) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	7832	8941	9452	8435
Endwert	9474	11587	7754	10183
Veränderung	1642	2646	-1698	1748

3.2.1.5. Neutrophile Granulozyten

Bei den Katzen der AMD/PMEA, der AMD- und der Placebogruppe stieg die durchschnittliche Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Therapieverlauf an, in der Placebogruppe um 1814 Zellen/ μ l, in der AMD-Gruppe um 1423 Zellen/ μ l und in der AMD/PMEA-Gruppe um 1000 Zellen/ μ l. In der PMEA-Gruppe kam es zu einem Abfall um 1043 Zellen/ μ l. Zu keinem Zeitpunkt lagen die Durchschnittswerte der einzelnen Gruppen unterhalb des Referenzbereiches (Abb. 21; Tab. 38 und 39). Die Änderung der Zahl neutrophiler Granulozyten zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der PMEA-Gruppe und der AMD- bzw. der Placebo-Gruppe (Tab. 37).

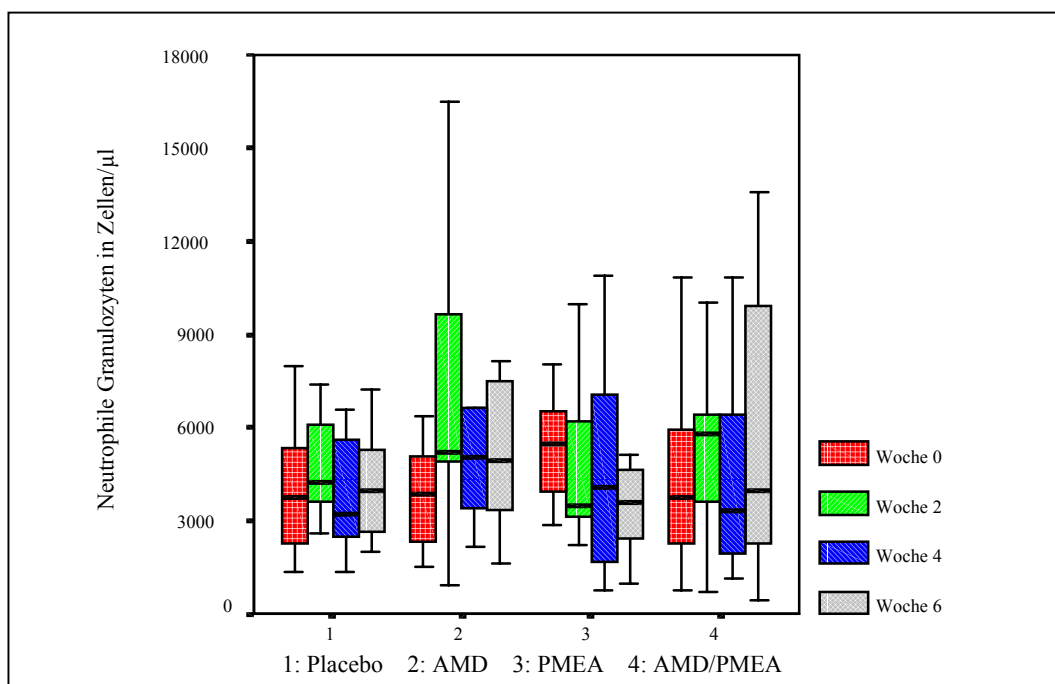


Abb. 21: Änderung der Zahl neutrophiler Granulozyten (in Zellen/μl) in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 37: Statistischer Vergleich der Unterschiede (p-Wert) der Zahl neutrophiler Granulozyten in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEa	AMD/PMEa
Placebo		0,257	0,049	0,545
AMD	0,257		0,049	0,257
PMEa	0,049	0,049		0,082
AMD/PMEa	0,545	0,257	0,082	

Tab. 38: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zahl neutrophiler Granulozyten (in Zellen/μl) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEa	AMD/PMEa
0	Mittelwert	4744	4519	5388	4314
	Standardabweichung	3607	3272	1719	3027
2	Mittelwert	5610	6889	4707	5625
	Standardabweichung	3972	4283	2598	2733
4	Mittelwert	5247	7614	4800	4798
	Standardabweichung	5504	7682	3614	3471
6	Mittelwert	6558	5942	4345	5314
	Standardabweichung	8547	4499	3629	4508

Tab. 39: Durchschnittliche Änderung der Zahl neutrophiler Granulozyten (in Zellen/ μ l) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	4744	4519	5388	4314
Endwert	6558	5942	4345	5314
Veränderung	1814	1423	-1043	1000

3.2.1.6. Lymphozyten

Die Lymphozytenzahl veränderte sich im Therapieverlauf in allen vier Gruppen, lag jedoch nie außerhalb des Referenzbereiches. Bei den Katzen der PMEA- und der Placebogruppe fiel die Lymphozytenzahl im Durchschnitt um 426 Zellen/ μ l bzw. 184 Zellen/ μ l ab. In der AMD3100- und der AMD/PMEA-Gruppe stieg die Lymphozytenzahl um 639 Zellen/ μ l und um 648 Zellen/ μ l an. (Tab. 40). Die Änderung der Lymphozytenzahl zwischen Therapiebeginn und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 41).

Tab. 40: Mittelwerte und Standardabweichungen der Lymphozytenzahl (in Zellen/ μ l) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	2215	3763	3237	3407
	Standardabweichung	1184	2687	1811	3244
2	Mittelwert	2649	5176	2961	4657
	Standardabweichung	1400	4256	1792	2784
4	Mittelwert	2342	5012	2412	3674
	Standardabweichung	1138	2331	1647	1599
6	Mittelwert	2031	4302	2811	4055
	Standardabweichung	975	2342	2883	2321

Tab. 41: Durchschnittliche Änderung der Lymphozytenzahl (in Zellen/ μ l) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	2215	3763	3237	3407
Endwert	2031	4302	2811	4055
Veränderung	-184	639	-426	648

3.2.2. Klinisch-chemische Laborparameter

An Tag 0, nach zwei, vier und sechs Wochen wurden bei allen Tieren die Leberenzym- und Leberfunktionsparameter, Nierenparameter, Gesamtprotein, Albumin und Globuline sowie die Serumelektrolyte bestimmt.

3.2.2.1. Leberparameter

Bei einem Tier in der AMD/PMEA-Gruppe stiegen die Aspartat-Amino-Transferase von 13 auf 54 U/l, die Alanin-Amino-Transferase von 37 auf 170 U/l und die Glutamat-Dehydrogenase von 0,8 auf 15,5 U/l bis zum Therapieende an. Klinisch zeigte dieses Tier keine Anzeichen einer Leberfunktionsstörung, es war über den gesamten Zeitraum bei gutem Allgemeinbefinden. Bei keiner anderen Katze zeigte sich eine Erhöhung dieser oder anderer Leberparameter.

3.2.2.2. Nierenparameter

Zwei Katzen zeigten vor Therapiebeginn Anzeichen einer Niereninsuffizienz, wobei eines dieser Tiere schon über einige Tage mit Infusionen behandelt worden war und die Werte von Harnstoff und Kreatinin wieder im Referenzbereich lagen. Bei dem zweiten Tier lagen während des gesamten Untersuchungszeitraumes beide Werte über dem Referenzbereich, es kam jedoch zu keiner Verschlechterung. Beide Tiere zeigten zudem einen dauerhaft erhöhten Phosphatwert. Zeitweilig wurde bei einigen Katzen ein geringgradig erhöhter Serum-Harnstoffwert gemessen, jedoch nie in Verbindung mit einem hohen Kreatininwert.

3.2.2.3. Proteine

Während des gesamten Beobachtungszeitraums zeigten zwei Katzen Gesamtproteinwerte über dem Referenzbereich, bedingt durch eine Erhöhung der Globuline. Die Werte lagen zwischen 110 g/l und 98,5 g/l. Beide Tiere zeigten klinisch eine hochgradige Stomatitis. Bei allen anderen Tieren lagen Gesamtprotein, Albumin und Globuline durchgehend im Referenzbereich.

3.2.2.4. Serum-Elektrolyte

Es wurden Natrium, Kalium, Chlorid, Phosphat, Kalzium und Magnesium im Serum ermittelt. Mit Ausnahme der beiden Katzen mit erhöhtem Phosphatwert,

lagen Natrium, Kalium, Chlorid und Phosphat bei allen Tieren innerhalb des Referenzbereiches. Die Werte von Magnesium und Kalzium wurden separat statistisch ausgewertet.

3.2.2.4.1. Magnesium

Bei den Tieren der Placebo- und der PMEa-Gruppe unterlag die Konzentration des Serum-Magnesiums im Verlauf der Therapie geringen Veränderungen. Dagegen zeigten alle Katzen, die AMD erhielten einen Abfall in der durchschnittlichen Magnesiumkonzentration. Bei drei Tieren der AMD/PMEa-Gruppe lag die Magnesiumkonzentration am Ende der Therapie mit 0,50, 0,40 und 0,32 mmol/l unter dem Referenzbereich (Abb. 22; Tab. 43 und 44). Die Änderung der Magnesiumkonzentration zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der Placebo- und der AMD- bzw. AMD/PMEa-Gruppe und zwischen der PMEa- und der AMD-Gruppe (Tab. 42).

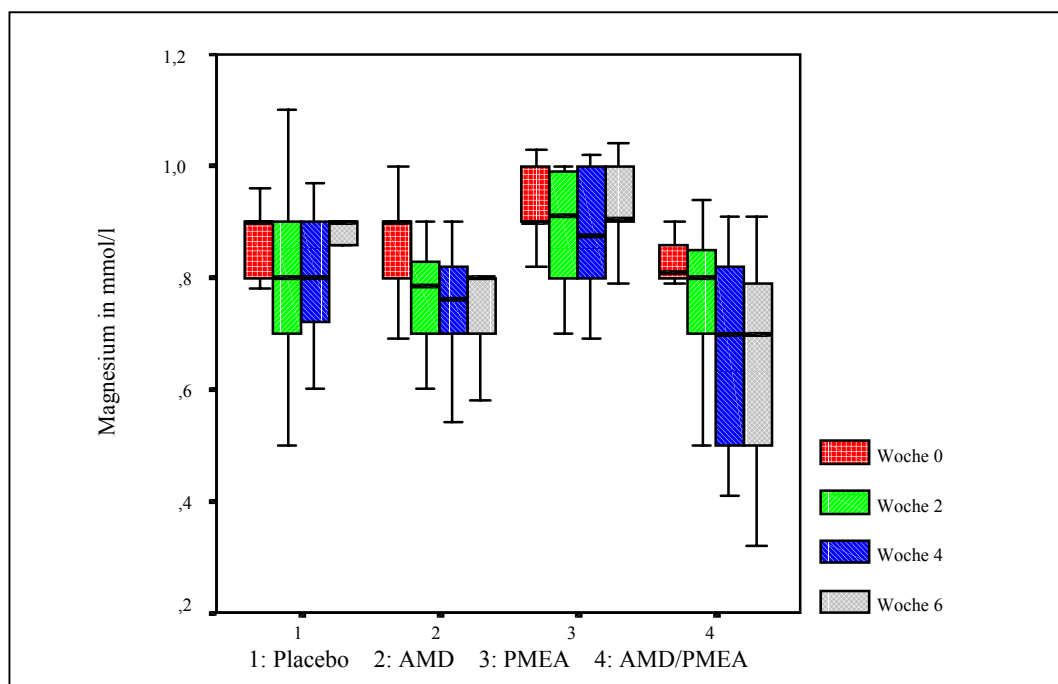


Abb. 22: Änderung der Magnesiumkonzentration (in mmol/l) in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 42: Statistischer Vergleich der Unterschiede (p-Wert) der Magnesiumkonzentration in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Placebo		0,021	0,878	0,015
AMD	0,021		0,103	0,381
PMEA	0,878	0,103		0,031
AMD/PMEA	0,015	0,381	0,031	

Tab. 43: Mittelwerte und Standardabweichungen der Magnesiumkonzentration (in mmol/l) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	0,855	0,868	0,907	0,820
	Standardabweichung	0,104	0,085	0,094	0,101
2	Mittelwert	0,802	0,776	0,894	0,770
	Standardabweichung	0,161	0,093	0,104	0,126
4	Mittelwert	0,804	0,748	0,874	0,681
	Standardabweichung	0,109	0,119	0,121	0,174
6	Mittelwert	0,871	0,786	0,922	0,652
	Standardabweichung	0,116	0,140	0,163	0,198

Tab. 44: Durchschnittliche Änderung der Magnesiumkonzentration (in mmol/l) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	0,855	0,868	0,907	0,820
Endwert	0,871	0,786	0,922	0,652
Veränderung	0,016	-0,082	0,015	-0,168

3.2.2.4.2. Kalzium

Es kam in allen Gruppen zu geringgradigen Veränderungen der Kalziumkonzentration im Serum. Bei den Tieren der Placebo- und der AMD/PMEA-Gruppe fiel der Kalziumwert um 0,01 bzw. 0,04 mmol/l. In der AMD- und der PMEA-Gruppe kam es zu einem Anstieg um je 0,01 mmol/ (Tab. 45). Die Änderung der Kalziumwerte zwischen Therapiebeginn und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 46).

Tab. 45: Mittelwerte und Standardabweichungen der Kalziumkonzentration (in mmol/l) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in den Wochen 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	2,48	2,50	2,44	2,49
	Standardabweichung	0,11	0,12	0,05	0,11
2	Mittelwert	2,45	2,45	2,39	2,37
	Standardabweichung	0,14	0,11	0,06	0,12
4	Mittelwert	2,47	2,43	2,42	2,41
	Standardabweichung	0,13	0,09	0,11	0,07
6	Mittelwert	2,47	2,51	2,45	2,45
	Standardabweichung	0,12	0,07	0,08	0,07

Tab. 46: Durchschnittliche Änderung der Kalziumkonzentration (in mmol/l) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	2,48	2,50	2,44	2,49
Endwert	2,47	2,51	2,45	2,45
Veränderung	-0,01	0,01	0,01	-0,04

3.3. Immunologische Parameter

Es erfolgte ein statistischer Vergleich der Anzahl der relativen und absoluten CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten und des CD4/CD8-Verhältnisses in den verschiedenen Gruppen. Die Katzen der verschiedenen Gruppen unterschieden sich durch ihre zum Teil stark voneinander abweichenden Anfangswerte.

3.3.1. Relative CD4⁺-Lymphozyten

Der Prozentsatz der relativen CD4⁺-Lymphozyten stieg bei den Katzen der AMD- und der PMEA-Gruppe im Durchschnitt um 0,78 % bzw. um 0,95 % an. In der Placebo- und der AMD/PMEA-Gruppe fielen sie um 5,79 % bzw. um 2,0 %. (Abb. 23; Tab. 48 und 49). Die Änderung der Zahl relativer CD4⁺-Lymphozyten zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der AMD- und der AMD/PMEA-Gruppe (Tab. 47).

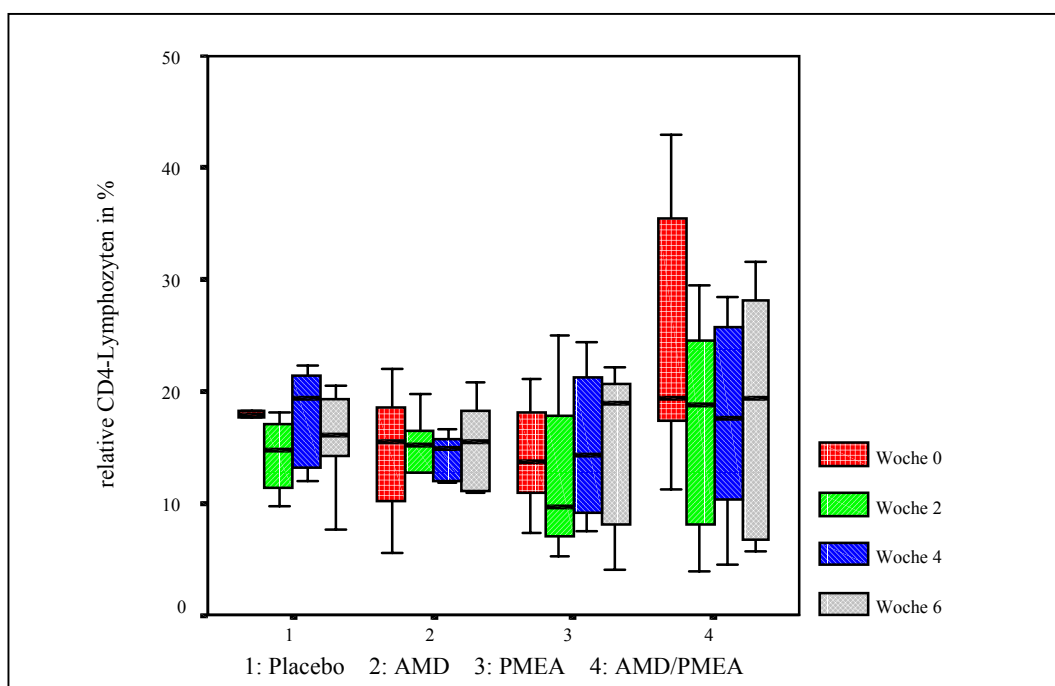


Abb. 23: Änderung der relativen CD4⁺-Lymphozyten (in %) in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 47: Statistische Auswertung der Unterschiede (p-Wert) der relativen CD4⁺-Lymphozyten in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEa	AMD/PMEa
Placebo		0,200	0,121	0,109
AMD	0,200		0,897	0,037
PMEa	0,121	0,897		0,071
AMD/PMEa	0,109	0,037	0,071	

Tab. 48: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen CD4⁺-Lymphozyten (in %) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche	Gruppe	Placebo	AMD	PMEa	AMD/PMEa
0	Mittelwert	17,62	14,56	14,25	24,32
	Standardabweichung	3,42	6,04	4,69	12,16
2	Mittelwert	14,34	14,14	12,42	17,28
	Standardabweichung	3,47	4,84	7,40	9,99
4	Mittelwert	17,93	14,35	15,13	17,32
	Standardabweichung	4,27	1,97	6,62	9,13
6	Mittelwert	15,62	15,34	15,20	18,53
	Standardabweichung	4,56	4,11	7,24	11,03

Tab. 49: Durchschnittliche Änderung der relativen CD4⁺-Lymphozyten (in %) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	17,62	14,56	14,25	24,32
Endwert	15,62	15,34	15,20	18,53
Veränderung	-2,0	0,78	0,95	-5,79

3.3.2. Absolute CD4⁺-Lymphozyten

Die Zahl der absoluten CD4⁺-Lymphozyten nahm in den sechs Wochen im Durchschnitt in allen vier Gruppen ab. Bei den Tieren der AMD/PMEA-Gruppe, die zu Beginn den höchsten Wert aufwiesen, war der Abfall am deutlichsten (Tab. 50). Die Änderung der absoluten CD4⁺-Lymphozytenzahlen zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 51).

Tab. 50: Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten CD4⁺-Lymphozyten (in Zellen/μl) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
0		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
	Mittelwert	417	532	545	1002
	Standardabweichung	334	776	349	1655
2	Mittelwert	449	902	438	1048
	Standardabweichung	276	1096	332	986
4	Mittelwert	473	624	418	793
	Standardabweichung	214	379	349	583
6	Mittelwert	340	519	515	869
	Standardabweichung	169	391	627	701

Tab. 51: Durchschnittliche Änderung der absoluten CD4⁺-Lymphozyten (in Zellen/μl) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	417	532	545	1002
Endwert	340	519	515	869
Veränderung	- 77	- 13	- 30	- 133

3.3.3. Relative CD8⁺-Lymphozyten

Die Anfangswerte der Katzen der einzelnen Gruppen unterschied sich nur geringgradig und auch unter Therapie wurden keine deutlichen Änderungen beobachtet. In der Placebo- und in der AMD-Gruppe kam es zu einem Abfall der relativen CD8⁺-Lymphozyten um 0,46 % bzw. um 1,08 %. Bei den Katzen der PMEA- und der AMD/PMEA-Gruppe stiegen sie um 0,24 % bzw. um 0,58 an (Tab. 52). Die Änderung der relativen CD8⁺-Lymphozytenzahl zwischen Therapiebeginn und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 53).

Tab. 52: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen CD8⁺-Lymphozyten (in %) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	16,58	16,78	14,69	13,91
	Standardabweichung	8,06	14,62	7,78	6,77
2	Mittelwert	13,88	18,30	11,50	13,42
	Standardabweichung	6,52	15,70	11,96	8,46
4	Mittelwert	17,45	19,71	14,26	12,79
	Standardabweichung	6,85	17,23	8,43	9,01
6	Mittelwert	16,12	15,70	14,93	14,49
	Standardabweichung	10,35	10,64	13,66	9,83

Tab. 53: Durchschnittliche Änderung der relativen CD8⁺-Lymphozyten (in %) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	16,58	16,78	14,69	13,91
Endwert	16,12	15,70	14,93	14,49
Veränderung	- 0,46	-1,08	0,24	0,58

3.3.4. Absolute CD8⁺-Lymphozyten

Bei den Katzen der Placebo-, der AMD- und der PMEA-Gruppe fielen die absoluten CD8⁺-Lymphozyten im Durchschnitt geringgradig ab. Nur in der AMD/PMEA-Gruppe kam es zu einem Anstieg, hier nahmen die absoluten CD8⁺-

Lymphozyten durchschnittlich um 223 Zellen/ μ l zu (Tab. 54). Die Änderung der absoluten CD8⁺-Lymphozytenzahlen zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 55).

Tab. 54: Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten CD8⁺-Lymphozyten (in Zellen/ μ l) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	379	503	530	357
	Standardabweichung	428	594	308	310
2	Mittelwert	465	792	427	687
	Standardabweichung	347	676	478	481
4	Mittelwert	482	716	365	552
	Standardabweichung	278	471	250	466
6	Mittelwert	378	451	443	580
	Standardabweichung	344	307	393	414

Tab. 55: Durchschnittliche Änderung der absoluten CD8⁺-Lymphozyten (in Zellen/ μ l) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	379	503	530	357
Endwert	378	451	443	580
Veränderung	-1	-52	-87	223

3.3.5. CD4/CD8-Quotient

Am deutlichsten fiel der CD4/CD8-Quotient bei den Katzen in der AMD/PMEA-Gruppe, um durchschnittlich 0,52 %, in der Placebogruppe nur um 0,05 %. Zu einem geringfügigen Anstieg des CD4/CD8-Quotienten kam es bei den Tieren der AMD und der PMEA-Gruppe um 0,06 % bzw. um 0,25 % (Tab. 56). Die Änderung des CD4/CD8-Quotienten zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 57).

Tab. 56: Mittelwerte und Standardabweichungen des CD4/CD8-Quotienten (in %) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	1,28	1,22	1,15	2,25
	Standardabweichung	0,65	0,78	0,50	1,86
2	Mittelwert	1,19	1,04	1,52	1,41
	Standardabweichung	0,47	0,53	0,77	0,67
4	Mittelwert	1,14	0,99	1,26	1,65
	Standardabweichung	0,38	0,44	0,59	1,03
6	Mittelwert	1,23	1,28	1,40	1,73
	Standardabweichung	0,58	0,66	0,75	1,35

Tab. 57: Durchschnittliche Änderung des CD4/CD8-Quotienten (in %) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	1,28	1,22	1,15	2,25
Endwert	1,23	1,28	1,40	1,73
Veränderung	- 0,05	0,06	0,25	- 0,52

3.4. Virologische Parameter

Es erfolgte eine statistische Auswertung des absoluten und relativen Provirus-Loads und des absoluten und relativen Virus-Loads.

3.4.1. Absoluter Provirus-Load

Der absolute Provirus-Load entspricht dem Prozentsatz der Lymphozyten im peripheren Blut (PBL), die mit dem feline Immunschwächevirus infiziert sind. Er nahm im Verlauf der Behandlung mit PMEA und AMD um 0,39 % bzw. um 0,15 % ab. In der AMD/PMEA-Gruppe wurde ein mäßiger Anstieg von 3,48 % gemessen, in der Placebogruppe zeigte sich mit 18,64 % ein deutlicher Anstieg (Tab. 58). Die Änderung des absoluten Provirus-Loads zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 59).

Tab. 58: Mittelwerte und Standardabweichungen des absoluten Provirus-Loads (in % infizierter PBL) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	6,059	2,328	0,817	3,149
	Standardabweichung	18,173	3,813	1,762	6,854
2	Mittelwert	21,347	2,256	0,552	5,375
	Standardabweichung	66,413	3,903	0,805	13,627
4	Mittelwert	4,428	1,867	0,665	7,486
	Standardabweichung	12,933	2,828	0,951	20,107
6	Mittelwert	24,697	1,933	0,668	6,628
	Standardabweichung	76,037	3,066	0,852	15,465

Tab. 59: Durchschnittliche Änderung des absoluten Provirus-Loads (in % infizierter PBL) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	6,06	2,33	0,82	3,15
Endwert	24,70	1,93	0,67	6,63
Veränderung	18,64	-0,40	-0,15	3,48

3.4.2. Relativer Provirus-Load

Da die Anfangswerte des absoluten Provirus-Loads sehr unterschiedlich waren, wurde der relative Provirus-Load zu besseren Vergleichbarkeit der Unterschiede herangezogen. Der relative Provirus-Load wurde aus den Werten des absoluten Provirus-Loads errechnet. Dabei wurden die Zahlen zu Beginn der Therapie gleich 100 % gesetzt und die Werte der folgenden Messungen als Prozent des Anfangswertes angegeben. Die Durchschnittswerte des relativen Provirus-Loads nahmen in der PMEA-, der AMD/PMEA- und der Placebogruppe bis Therapieende um 41, 75 und 79 % zu. Bei den Katzen der AMD-Gruppe kam es zu einem durchschnittlichen Abfall um 5 % (Abb. 24; Tab. 61 und 62). Die Änderung des relativen Provirus-Loads zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich statistisch signifikant im Einzelvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test zwischen der AMD- und der Placebo- bzw. der AMD/PMEA-Gruppe (Tab. 60).

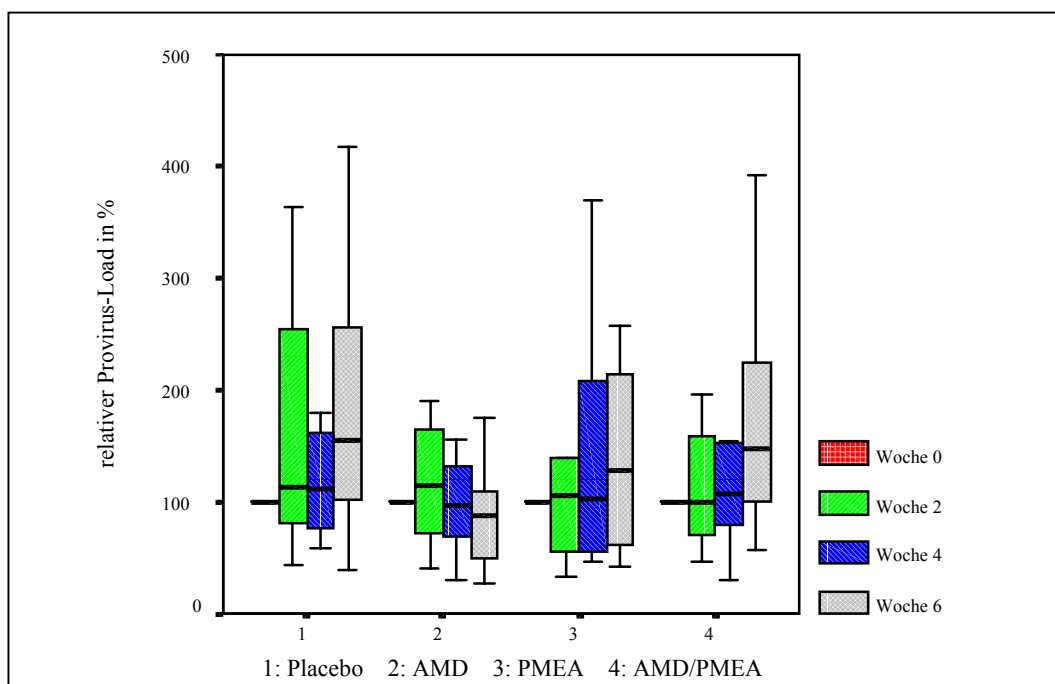


Abb. 24: Änderung des relativen Provirus-Loads (in %) vom Wert in Woche 0 in den vier Behandlungsgruppen im Verlauf der Therapie

Tab. 60: Statistischer Vergleich der Unterschiede (p-Wert) des relativen Provirus-Loads in den verschiedenen Behandlungsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (fett = statistisch signifikant)

	Placebo	AMD	PMEa	AMD/PMEa
Placebo		0,049	0,545	0,940
AMD	0,049		0,199	0,041
PMEa	0,545	0,199		0,496
AMD/PMEa	0,940	0,041	0,496	

Tab. 61: Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen Provirus-Loads (in %) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6 (Wert in Woche 0 entspricht 100%)

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEa	AMD/PMEa
0	Mittelwert	100	100	100	100
	Standardabweichung	0	0	0	0
2	Mittelwert	157	117	137	112
	Standardabweichung	108	49	120	50
4	Mittelwert	128	98	144	122
	Standardabweichung	75	40	107	69
6	Mittelwert	179	95	141	175
	Standardabweichung	58	101	81	111

Tab. 62: Durchschnittliche Änderung des relativen Provirus-Loads (in %) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	AMD	AMD/PMEA	PMEA	Placebo
Anfangswert	100	100	100	100
Endwert	95	175	141	179
Veränderung	- 5	75	41	79

3.4.3. Absoluter Virus-Load

Der absolute Virus-Load wurde direkt in der real-time-PCR gemessen. Er gibt die Anzahl an Virus-Partikeln an, die sich in 1 ml Plasma befand. In der Placebogruppe stieg der absolute Virus-Load um durchschnittlich 726745 Kopien/ml Plasma. In der PMEA-, der AMD- und der AMD/PMEA-Gruppe nahm die Menge an Virus-RNA um 164 Kopien/ml Plasma, um 1823 Kopien/ml Plasma bzw. um 78087 Kopien/ml Plasma ab (Tab. 63). Die Änderung des absoluten Virus-Loads zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 64).

Tab. 63: Mittelwerte und Standardabweichungen des absoluten Virus-Loads (in Kopien RNA/ml Plasma) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	348773	5007	1269	88518
	Standardabweichung	1092967	8040	748	251088
2	Mittelwert	2329270	1789	1025	40030
	Standardabweichung	7364336	2297	1414	93980
4	Mittelwert	355248	3156	684	26692
	Standardabweichung	1111293	4933	872	70276
6	Mittelwert	1075518	3184	1105	10431
	Standardabweichung	3377516	5168	1918	20850

Tab. 64: Durchschnittliche Änderung des absoluten Virus-Loads (in Kopien RNA/ml Plasma) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	348773	5007	1269	88518
Endwert	1075518	3184	1105	10431
Veränderung	726745	- 1823	- 164	- 78087

3.4.1.4. Relativer Virus-Load

Der relative Virus-Load ergab sich rechnerisch aus den Werten des absoluten Virus-Loads, wobei die Anfangswerte gleich 100 % gesetzt wurden. Die Werte der einzelnen Katzen in den folgenden Wochen wurden als Prozentsatz dieses Anfangswertes angegeben. Der relative Virus-Load gewährleistet eine bessere Vergleichbarkeit, da die Anfangswerte sehr unterschiedlich waren. Bei den Katzen in der PMEA- und AMD/PMEA-Gruppe fiel der Prozentsatz der Viruslast durchschnittlich um 42 % bzw. um 61 %. In der Placebo- und der AMD-Gruppe stieg die relative Virusbelastung im Mittel um 1403 % bzw. um 294 % (Tab. 65). Die Änderung des relativen Virus-Loads zwischen Therapieanfang und -ende unterschied sich im Einzelvergleich der vier Gruppen im Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant (Tab. 66).

Tab. 65: Mittelwerte und Standardabweichungen des relativen Virus-Loads (in %) der Katzen in den vier Behandlungsgruppen in Woche 0, 2, 4 und 6 (Wert in Woche 0 entspricht 100 %)

Woche		Gruppe			
		Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
0	Mittelwert	100	100	100	100
	Standardabweichung	0	0	0	0
2	Mittelwert	143	387	97	89
	Standardabweichung	220	1008	90	137
4	Mittelwert	282	277	42	55
	Standardabweichung	641	696	42	75
6	Mittelwert	1503	394	58	39
	Standardabweichung	4278	1001	83	47

Tab. 66: Durchschnittliche Änderung des relativen Virus-Loads (in %) zwischen Therapieanfang und Therapieende

	Gruppe			
	Placebo	AMD	PMEA	AMD/PMEA
Anfangswert	100	100	100	100
Endwert	1503	394	58	39
Veränderung	1403	294	-42	-61

3.5. Hemmung der Virusreplikation *in vitro*

Die Messung der Medikamentenkonzentration, bei der 50 % der Virusreplikation unterdrückt wurden (EC_{50}), blieb für jeden individuell isolierten Virusstamm weitgehend identisch. Bei einigen Tieren konnte die EC_{50} nicht bestimmt werden, da sich die PBL in der Zellkultur nicht vermehrten. Die Werte der 50 %-Hemmkonzentrationen (in ng/ml) sind in Tab. 67 dargestellt. Es wurde keine Resistenzentwicklung der FIV gegen AMD3100 *in vivo* im Therapiezeitraum von sechs Wochen beobachtet.

Tab.67: Werte der EC_{50} (in ng/ml) der Katzen zu Therapiebeginn und am Ende der beiden mit AMD3100 behandelten Gruppen (n. b. = nicht bestimmt)

Katze	Medikament	EC_{50} Woche 0	EC_{50} Woche 6
Nikodemus	AMD	12,3	19,2
Pico	AMD	91,0	245,2
Whisky	AMD	22,1	33,2
Queeny	AMD	112,3	140,5
Imelda	AMD	152,2	121,0
D'Artagnan	AMD	253,6	193,6
Mauser	AMD	n. b.	n. b.
Gipsy	AMD	n. b.	n. b.
Lupus	AMD	45,5	n. b.
Pidi	AMD	n. b.	n. b.
Hank	AMD / PMEA	119,6	136,1
Mikesch	AMD / PMEA	33,0	34,8
Speedy	AMD / PMEA	n. b.	n. b.
Tiger	AMD / PMEA	133,4	319,0
Franz-H..	AMD / PMEA	1549,2	510,5
Olga	AMD / PMEA	n. b.	n. b.
Leo	AMD / PMEA	276,0	n. b.
Augi	AMD / PMEA	n. b.	n. b.
Ellie	AMD / PMEA	0,0	0,0
Odin	AMD / PMEA	n. b.	n. b.

V. Diskussion

1. Prävalenz der FIV-Infektion

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden in 83 von 3611 unselektierten Katzenseren, die überwiegend aus dem süddeutschen Raum stammten, Antikörper gegen FIV nachgewiesen. Das entsprach einer Prävalenz von 2,3 %. Ein ähnlicher Prozentsatz FIV-infizierter Katzen war auch in früheren Studien, die anhand von Serumproben aus demselben Einzugsgebiet durchgeführt wurden, ermittelt worden. Die Prävalenz der FIV-Infektion lag 1991 bei 2,3 % (HARTMANN et al., 1991), 1994 bei 2,2 % (HARTMANN et al., 1994) und 1996 bei 2,3 % (WILHELM, 1996). Das zeigt, dass die Infektionsrate von FIV trotz Aufklärung der Tierbesitzer und zunehmender Beachtung durch Tierärzte konstant bleibt.

SODORA und Mitarbeiter (1995) und BACHMANN und Mitarbeiter (1997) gehen davon aus, dass es sich bei FIV um ein sehr altes Virus handelt, das weltweit schon lange in der Katzenpopulation vorhanden ist. Antikörper gegen FIV wurden in Seren aus den Jahren 1966 und 1972 in Japan bzw. Australien nachgewiesen (SABINE et al., 1988; FURUYA et al., 1990). FIV wurde bei Katzen auf allen Kontinenten und vielen Inseln nachgewiesen (STENGEL et al., 2001). Möglicherweise wurde es im Zeitalter der Seefahrer durch die Schiffskatzen auf den Entdecker- und Handelsschiffen in der ganzen Welt verbreitet. COURCHAMP und Mitarbeiter (1995) stellten fest, dass sich die Prävalenz der FIV-Infektion innerhalb einer Population auf einem stabilen Niveau einpendelt, das von der Anzahl der empfänglichen und der infizierten Tiere abhängig ist. Dabei sind am häufigsten ranghohe Kater infiziert, da sie durch Kämpfe und Bisse eine hohe Übertragungsrate garantieren. Rangniedere Tiere spielen bei der Weiterverbreitung keine Rolle und sind selten Virusträger (COURCHAMP et al., 2000). In einer festen sozialen Struktur, in der Rangkämpfe selten sind, ist die Rate der Neuinfektionen gering (SHELTON et al., 1989).

Gründe für die unveränderte Prävalenz könnten in der geringen Pathogenität von FIV und der relativ geringen Übertragungsrate liegen. Die Infektion hat keinen Einfluss auf die Lebenserwartung infizierter Katzen, so dass diese lange genug leben, um zur Weiterverbreitung beizutragen. Andererseits leben im untersuchten

Einzugsgebiet nur wenige „herrenlose“ oder „verwilderte“ Katzen, die als Reservoir für die FIV-Infektion dienen. In enger besiedelten Katzenpopulationen, wie z. B. in einigen Gegenden Italiens, Frankreichs oder Englands (BRALEY, 1994) ist die Prävalenz sehr viel höher.

2. Therapiestudie

Zur Beurteilung des Therapieerfolges wurden klinische, labordiagnostische, immunologische und virologische Parameter erfasst. Entscheidend für den Erfolg der Therapie sind das Wohlbefinden der Patienten, die Verbesserung der Lebensqualität und die Verträglichkeit der Medikamente. Für die möglichst objektive Beurteilung der einzelnen klinischen Symptome wurden Ausdehnung und Schweregrad der Symptome sowie deren Veränderungen im Verlauf der Therapie nach einem 10-Punkte-Schema beurteilt. Ein ähnliches Schema hatte sich schon in vorausgegangenen Studien bewährt (WILHELM, 1996; KUFFER et al., 1997; AIGNER, 2000). Die Untersuchungen wurden stets vom gleichen Untersucher durchgeführt, um eine konstante und gleichmäßige Einschätzung der Symptome zu gewährleisten. Subjektive Einflüsse wirken sich in einer placebokontrollierten Doppelblindstudie auf alle Gruppen aus, daher ist ihr Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse zu vernachlässigen.

2.1. Patienten

Die in die Untersuchung aufgenommenen Katzen waren zwischen elf Monaten und elf Jahren alt, das Durchschnittsalter lag bei 6,4 Jahren. 70 % der Tiere waren männlich, 30 % weiblich; alle waren kastriert. Die Patienten dieser Studie stellten eine „repräsentative Gruppe“ FIV-infizierter Katzen dar. Sie entsprachen sowohl bezüglich der Altersstruktur als auch der Geschlechtsverteilung anderen untersuchten FIV-infizierten Katzenpopulationen (HARTMANN und HINZE, 1991; WILHELM, 1996; AIGNER, 2000). Das gehäufte Vorkommen von FIV bei älteren Katzen reflektiert dabei keine höhere Empfänglichkeit alter Tiere, sondern die lange Latenzphase der FIV-Infektion (HOSIE et al., 1989). FIV wird meist horizontal und nicht vertikal übertragen, daher ist das Risiko bei erwachsenen Tieren höher als bei jungen.

Bei der statistischen Auswertung dieser Studie ergaben sich hohe Standardabweichungen für einzelne Parameter, wahrscheinlich durch die relativ

geringe Patientenzahl und die Heterogenität der Gruppen. Die Heterogenität war Folge der randomisierten Zuteilung der Medikamente und des Verzichts auf weitere Einschlusskriterien, wie z. B. des Krankheitsstadiums. Eventuell hätte sich durch eine Erhöhung der Patientenzahl bei Veränderung einiger Parametern eine statistische Signifikanz ergeben. Eine höhere Anzahl an Tieren wäre aber mit einer Verlängerung der Studiendauer verbunden gewesen. Die *in-vivo*-Prüfung antiviraler Medikamente sollte in kurzen Zeitrahmen erfolgen, um neue Entwicklungen zu fördern und Wirkung und Nebenwirkungen frühzeitig aufzuzeigen.

2.1.1. Klinische Parameter

Häufig auftretende Symptome bei FIV-infizierten Katzen sind Entzündungen der Maulhöhle (EGBERINK und HORZINEK, 1992). In der vorliegenden Studie zeigten alle Tiere Maulhöhlenentzündungen unterschiedlicher Ausprägung. Bei FIV-infizierten Katzen entstehen Maulhöhlenentzündungen häufig durch Koinfektion mit dem feline Calicivirus (TENORIO et al., 1991). Caliciviren werden bei ihnen in höheren Mengen mit dem Speichel ausgeschieden als bei nicht-infizierten Tieren (REUBEL et al., 1994). Alle Katzen hatten zu Beginn der Studie eine Entzündung der Maulhöhle. Therapieverlauf zu einer Verbesserung der Maulhöhlenentzündung (Einschlusskriterium).

Weniger als die Hälfte der Tiere litt zu Beginn der Studie an einer durchschnittlich nur geringgradig ausgeprägten Konjunktivitis. Das Symptom Rhinitis trat nur bei einer geringen Anzahl von Tieren auf, daher war eine statistische Auswertung nicht sinnvoll. Bei wenigen Tieren wurde jeweils einmal Erbrechen, ohne Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden beobachtet. Alle drei Tiere mit Abmagerung nahmen im Verlauf der Therapie zu, wahrscheinlich bedingt durch Pflege und Handfütterung. Beide Tiere mit Niereninsuffizienz wiesen am Ende deutlich niedrigere Nierenwerte auf, auch hier wurde die Besserung der symptomatischen Therapie in Form von Infusionen zugeschrieben. Bei dem Tier mit eosinophilem Granulom zeigte sich wenig Änderung der Hautveränderungen. Das entsprach dem für dieses Tier typischen phasenweisen Verlauf des eosinophilen Granuloms.

Das Körpergewicht gilt in der Humanmedizin als bedeutender Parameter, da sich Wohlbefinden und Gesundheitszustand im Appetit und konsekutiv in der

Zunahme der Körpermasse äußern. Bei Katzen gilt dies in besonderem Maße, da ihr Fressverhalten maßgeblich vom Allgemeinbefinden und auch von psychischen Faktoren beeinflusst wird.

Als Kriterium für das Wohlbefinden und die Lebensqualität der Patienten hat der Karnofsky-Index eine entscheidende Funktion bei der Beurteilung des Therapieerfolges (HARTMANN und KUFFER, 1998). Katzen können sehr empfindlich auf Umgebungswechsel wie z. B. Hospitalisierung reagieren. Derartige Wechsel äußern sich oft in einer Verschlechterung der Kriterien, die für die Beurteilung des Karnofsky-Indexes herangezogen werden. Da alle Tiere schon innerhalb der ersten beiden Therapiewochen eine Besserung der Lebensqualität zeigten, kann ein Einfluss der Hospitalisierung ausgeschlossen werden.

2.1.2. Labordiagnostische Parameter

Zu Beginn der Studie wiesen je zwei Patienten der Placebo- und der PME- und einer der AMD-Gruppe Erythrozytenzahlen, Hämoglobin- und Hämatokritwerte unterhalb des Referenzbereiches auf. Das entspricht einem Anteil von 13 % anämischer Katzen im Patientengut und liegt damit zwischen der bei AIGNER (2000) und WILHELM (1996) ermittelten 10 % und den von HARTMANN (1995) ermittelten 16 %. Im Gegensatz zu den Tieren bei AIGNER (2000) konnte in dieser Studie in den ersten Wochen kein Abfall der Hämoglobin- und Hämatokritwerte beobachtet werden, obwohl den Tieren zu Beginn der Therapie großen Mengen (10 ml Vollblut) Blut abgenommen.

Die durchschnittliche Leukozytenzahl lag in allen Gruppen immer innerhalb des Referenzbereiches. In der vorliegenden Studie wurden, wie schon bei AIGNER (2000) und WILHELM (1996) beschrieben, Schwankungen bis zu 130 % vom Ausgangswert beobachtet. Von einigen Autoren wurde bei bis zu 29 % der FIV-infizierten Katzen eine Lymphopenie beobachtet (SPARKES et al., 1993; WALKER und CANFIELD, 1996). In dieser Studie zeigten zu Beginn 10 % der Katzen, je ein Tier aus der Placebo- und AMD-Gruppe und zwei Tiere aus der AMD/PME-Gruppe, Lymphozytenzahlen unterhalb des Referenzbereiches (WILLARD und TVEDTEN, 1999). Möglicherweise spielt bei diesem Unterschied die Auswahl der Katzen eine Rolle. In der vorliegenden Studie zeigten viele Katzen nur geringgradige Krankheitssymptome. Die meisten Tiere waren klinisch „gesund“. Dagegen gingen in die Untersuchungen von SPARKES

und Mitarbeiter (1993) chronisch kranke Katzen ein, die bereit in fortgeschrittenen Stadien der Infektion befanden.

Eine Katze aus der Placebo- und eine aus der AMD-Gruppe, die beide an einer hochgradigen Maulhöhlenentzündung litten, zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum eine Erhöhung des Gesamtproteins im Serum. Dies war durch erhöhte Globulinwerte bedingt, die auch schon zu Therapiebeginn gemessen worden waren. HARLEY und Mitarbeiter (2003) wiesen bei Katzen mit chronischen Entzündungen der Maulhöhle erhöhte Serum-Konzentrationen von Immunglobulinen der Klasse M, G und A nach. Die IgM- und IgG-Erhöhung korrelierte mit ebenfalls erhöhten IgM- und IgG-Konzentrationen im Speichel (HARLEY et al., 2003). Das Immunsystem reagiert durch Produktion großer Mengen Immunglobuline als Antwort auf den Erreger der Entzündung, in der Maulhöhle oft Calici- oder Herpesviren. Dadurch wären die hohen Serum-Globulin-Werte der beiden Katzen zu erklären.

2.1.3. Immunologische Parameter

Die durchschnittlichen Werte der relativen und absoluten $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Lymphozyten unterschieden sich von den von HOFFMANN-FEZER und Mitarbeitern (1991, 1992, 1996) bei FIV-infizierten Katzen gemessenen Werten. Die relativen $CD4^+$ -Zellen lagen zu Beginn mit 14,2 bis 24,3 % unter dem von HOFFMANN-FEZER und Mitarbeiter (1996) gemessenen Wert von 31,8 %. NOVOTNEY und Mitarbeiter (1990) ermittelten einen Median der $CD4^+$ -Zellen FIV-infizierter Katzen von 13,3 %. Die Werte der relativen $CD8^+$ -Zellen waren mit 13,9 bis 16,7 % ebenfalls niedriger als die anderer FIV-positiver Katzensgruppen und entsprachen den $CD8^+$ -Zellzahlen gesunder Katzen (HOFFMANN-FEZER et al., 1991, 1992, 1996). Der $CD4/CD8$ -Quotient der Patienten bewegte sich mit 1,1 bis 2,2 dagegen in dem für FIV-infizierte Katzen ermittelten Bereich und unterschieden sich deutlich von den Werten gesunder Katzen (HOFFMANN-FEZER et al., 1990, 1991, 1992; HARTMANN, 1995).

Bei Katzen korreliert die absolute Zahl der $CD4^+$ -Zellen nicht mit der Immunsuppression (WALKER et al., 1996). Es bestehen nur geringe Unterschiede in den Lymphozyten-Subpopulationen bei Katzen in verschiedenen Stadien der FIV-Infektion (WALKER et al., 1994). So wurden Werte bis 37 $CD4^+$ -Zellen/ μ l bei klinisch gesunden Katzen gefunden. Dies steht im Gegensatz

zu den Beobachtungen beim Menschen. ROSENBERG und Mitarbeiter (1997) zeigten, dass bei HIV-infizierten hohe $CD4^+$ -Zell-Zahlen mit der Kontrolle der Virämie verbunden sind. Infizierte, deren $CD4^+$ -Zellen im Referenzbereich lagen, waren in der Lage, den Virus-Load gering zu halten, und es bestand eine direkte Korrelation zwischen reduzierter Immunfunktion und Zahl der $CD4^+$ -Zellen (PANTALEO et al., 1996). Bei Menschen wird ein Abfall der $CD4^+$ -Zellen unter $200/\mu l$ als Kriterium für den Übergang in das AIDS-Stadium gewertet.

2.1.4. Virologische Parameter

Die quantitative Bestimmung des Provirus- und Virus-Loads ist eine sehr empfindliche Methode zur Evaluierung des Stadiums HIV-Infektion und der Prognose (MELLORS et al., 1996) und ist in besonderem Maße zur Kontrolle eines möglichen Therapieerfolges geeignet (GULICK et al., 1997; HAMMER et al., 1997). Die „real-time-PCR“ zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität, eine hohe Reproduzierbarkeit und einen weiten linearen Messbereich aus (KLEIN et al., 2000). Sequenzunterschiede im FIV-Genom sind in der Lage, die Stabilität der Primer- und Sondenbindung zu beeinflussen. Dadurch können die Ergebnisse der quantitativen real-time-PCR durch Mutationen dieser Bindungssequenzen verändert werden (KLEIN et al., 1999). Für Studien sollte daher im Vorfeld für jedes Tier ein geeignetes Primer-Sonden-Paar ermittelt werden. Die Beurteilung des Virus-Loads im Plasma mit der real-time-PCR ergibt analog zur DNA-Messung reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse, wobei die Bindung der Primer und Sonden ebenfalls durch Sequenzunterschiede beeinflusst werden kann (KLEIN et al., 2001).

2.2. Beurteilung der Medikamente

Zur Beurteilung der Medikamente wurden die Nebenwirkungen und die antivirale Wirksamkeit ausgewertet. Dabei wurden beide Substanzen einzeln und die Kombinationstherapie untersucht.

2.2.1. PMEA

PMEA war bei den Katzen gut verträglich. Klinisch wurde bei einige Tieren eine Anämie festgestellt, jedoch ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens.

2.2.1.1. Nebenwirkungen

Eine klinisch feststellbare Nebenwirkung von PMEA in dieser Studie war die Schmerzhaftigkeit bei der subkutanen Applikation. Einige Tiere zeigten deutliche Schmerzreaktionen, während andere nur wenig reagierten. Hautreaktionen oder deutliche Entzündungen entwickelten sich an den Injektionsstellen jedoch nicht.

Die Werte der Erythrozytenzahlen, des Hämoglobins und Hämatokrits fielen bei den Tieren der beiden Gruppen, die PMEA erhielten, statistisch signifikant ab. Bei keinem der Tiere musste die Therapie wegen zu niedriger Erythrozytenwerte abgebrochen werden. Bereits in mehreren Studien wurde nach Gabe von PMEA und anderen ANP ein signifikanter Abfall des Hämoglobins und Hämatokrits beobachtet (DONATH, 1992; WILHELM, 1996; KUFFER et al., 1997; AIGNER, 2000). Klinisch zeigten die anämischen Katzen in dieser Studie nur selten Nebenwirkungen in Form von Müdigkeit, jedoch ohne Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens und der Futteraufnahme. Der statistische Vergleich zeigte zudem eine signifikante Erniedrigung der Zahl neutrophiler Granulozyten in der PMEA-Gruppe im Vergleich zur AMD- und Placebogruppe.

Mehrere Autoren beschrieben schon die toxische Wirkung der ANP auf das hämatopoetische System, die einen Rückgang der Erythrozyten- und Leukozytenzahlen bedingte (EGBERINK et al., 1990; HASCHEK et al., 1990; HOOVER et al., 1991; HARTMANN et al., 1992). Der aktive Metabolit des PMEA, das zweifach phosphorylierte PMEApp unterdrückt nicht nur die Aktivität der Reversen Transkriptase, es bewirkt auch in eine Hemmung der zellulären DNA-Polymerasen in der Wirtszelle (PISAREV et al., 1997). Dadurch wird, abhängig von der intrazellulären Konzentration von PMEApp, die Vermehrung der Wirtszellen gehemmt (OTOVA et al., 1997). Die Vorläuferzellen im Knochenmark werden wahrscheinlich durch den Wirkmechanismus des PMEA in ihrer Zellteilungsgeschwindigkeit gehemmt. Reife Erythrozyten können dann nur in geringerem Maße in das periphere Blut abgegeben werden und ihre Anzahl sinkt mit der Dauer der PMEA-Gabe. Dies erklärt auch den schnellen Anstieg des Hämatokrits nach Ende der Therapie. Die Vorläuferzellen im Knochenmark sind durch die PMEA-Gabe nicht zerstört worden und können sich nach Abbau des intrazellulär vorhandenen PMEA wieder vermehren. Die Nebenwirkung beschränkt sich auf den Zeitraum der Applikation.

Neben der Änderung des roten Blutbildes nahmen die neutrophilen Granulozyten in der PMEA-Gruppe im Vergleich zur Placebo- und zu den beiden anderen Verumgruppen statistisch signifikant ab. HASCHEK und Mitarbeiter (1990) und HOOVER und Mitarbeiter (1991) führten die Leukozytenabnahme durch den Rückgang der neutrophilen Granulozyten unter PMEA-Therapie ebenfalls auf eine Suppression der Stammzellproliferation im Knochenmark zurück.

2.2.1.2. Wirksamkeit

In dieser Studie zeigte sich durch die Therapie mit PMEA eine statistisch signifikante Besserung der Maulhöhlenentzündung. Eine signifikante Besserung dieses Parameters wurde schon bei WILHELM (1996) durch ANP-Gabe über sechs Wochen erreicht. Auch EGBERINK und Mitarbeiter (1990a) erzielten mit PMEA eine weitgehende Heilung von Stomatitiden bei natürlich FIV-infizierten Katzen. PMEA und anderen ANP werden antiproliferative Effekte (ANDREI et al., 1998) und immunmodulatorische Eigenschaften durch Verstärkung der NK-Zellaktivität und der Interferonproduktion (DEL GOBBO et al., 1991; CALIO et al., 1994) zugeschrieben. PMEA zeigt zudem ein breites Wirkspektrum gegen verschiedene DNA-Viren, darunter auch Herpesviren (EGBERINK et al., 1990; DE CLERCQ, 1997). Bei der Entstehung der Maulhöhlenentzündung der Katzen könnten sowohl Herpes- als auch Caliciviren gespielt eine Rolle haben. Die Verstärkung der zellvermittelten Immunität und der antiproliferative Effekt von PMEA könnten sich auf Koinfektionen mit dem feline Calicivirus auswirken und dadurch die Stomatitis positiv beeinflussen. Dabei könnte die immunstimulierende Wirkung und die Aktivierung der NK-Zellaktivität (DEL GOBBO et al., 1991; CALIO et al., 1994) direkte antivirale Effekte haben. Die Proliferations-hemmende Wirkung könnte sich auf die Maulschleimhaut ausgewirkt haben. Dadurch wäre die Besserung des übermäßigen Wachstums der Schleimhaut erklärbar.

Die Konjunktivitis besserte sich bei den Katzen aller Therapiegruppen. In der PMEA-Gruppe wurde die deutlichste Verbesserung beobachtet, statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den anderen Gruppen ergaben sich nicht. Eine nicht signifikante Besserung der Konjunktivitis unter PMEA-Gabe wurde auch von WILHELM (1996) beobachtet.

Es wurde ein im Therapiezeitraum ein Anstieg der Körpermasse in allen Gruppen beobachtet, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. In anderen Studien bewirkte PMEa innerhalb eines Therapiezyklus von sechs Wochen eine Gewichtsabnahme der Katzen (WILHELM, 1996; KUFFER et al., 1997; AIGNER, 2000). AIGNER (2000) behandelte Katzen in einer Langzeitstudie über drei Mal sechs Wochen mit jeweils zehn Wochen Pause zwischen den Therapiezyklen. Über den gesamten Zeitraum konnte hier ebenfalls eine Zunahme der Körpermasse feststellen.

Der Karnofsky-Index stieg in den beiden Gruppen, die PMEa erhielten an, die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant. Steigerung des Körpergewichts und des Karnofsky-Indexes sind Ausdruck gesteigerten Wohlbefindens der Tiere, ein Einfluss des PMEa auf diese Parameter lässt sich nicht nachweisen.

Es wurde keine signifikante Verbesserung der immunologischen Parameter nach PMEa-Gabe beobachtet. Die absoluten Zellzahlen der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen verringerten sich, die relativen Zahlen nahmen zu. Die Erhöhung des CD4/CD8-Quotienten war ebenfalls nicht signifikant. WILHELM (1996) und AIGNER (2000) erzielten durch Gabe von ANP einen Anstieg des CD4/CD8-Quotienten. Im Gegensatz dazu beobachteten VAHLENKAMP und Mitarbeiter (1995) bei experimentell FIV-infizierten Katzen unter PMEa-Therapie keine Beeinflussung des CD4/CD8-Quotienten.

Bei der Bestimmung der virologischen Parameter in der PMEa-Gruppe wurde ein Rückgang des absoluten und ein Anstieg des relativen Provirus-Load beobachtet. Der absolute und relative Virus-Load zeigte unter PMEa-Behandlung keinen signifikanten Rückgang. In anderen Studien konnte mit PMEa eine Reduktion des Provirus-Loads (PHILPOTT et al., 1992; TSAI et al., 1995) erzielt werden. BRIDGER und Mitarbeiter (1999) stellten eine statistisch signifikante Reduktion der viralen DNA bei experimentell HIV-infizierten Mäusen fest. TSAI und Mitarbeiter (1995, 2000) erreichten bei Makkaken durch die Behandlung mit PMEa eine Reduktion des Provirus-Load. Bei experimentell FIV-infizierten Katzen konnte ebenfalls eine Reduktion der proviralen DNA in PBL durch die Applikation von PMEa erreicht werden (PHILPOTT et al., 1992). Eine Reduktion des Virus-Loads durch PMEa-Therapie wurde von VAHLENKAMP und Mitarbeitern (1995) bei experimentell FIV-infizierten Katzen beobachtet.

2.2.2. AMD3100

AMD3100 wurde von allen Tieren gut vertragen und klinisch konnten keine Nebenwirkungen festgestellt werden. In Phase-II-Studien bei Menschen wurden Nebenwirkungen auf die Herzaktivität beobachtet, die sich in einer Arrhythmie äußerten; möglicherweise eine Folge der Blockade des CXCR4 (AnorMED, www.anormed.com/products/cxcr4/index.html, Produktinformation 2003).

2.2.2.1. Nebenwirkungen

Einflüsse des AMD3100 auf die Herzaktion konnte bei keiner der Katzen festgestellt werden. Sowohl die auskultatorische Herz-Untersuchung als auch die EKG-Messungen gaben keinen Hinweis auf unerwünschte Wirkungen auf die Herzfunktion.

AMD3100 bewirkte eine statistisch signifikante Erniedrigung des Serum-Magnesiumwertes, die keine klinischen Symptome hervorrief. HENDRIX und Mitarbeiter (2000) stellten bei Menschen nach Gabe von AMD3100 eine Erhöhung des Magnesiums fest. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt Magnesium an der Zellmembran ähnlichen Ein- und Ausstrommechanismen wie Kalium, dagegen wird es aus dem Darm nach den gleichen Regeln wie das ebenfalls zweiwertige Kation Kalzium resorbiert (NELSON und COUTO, 1998). Es wäre möglich, dass Magnesium teilweise mit Kalzium in die Zellen gelangt. Die natürliche Aktivierung von CXCR4 durch SDF-1 bedingt einen Kalziumeinstrom in die Zelle. ZHANG und Mitarbeiter (2002) wiesen nach, dass AMD3100, entgegen den Beobachtungen anderer Studien (DONZELLA et al., 1998; BRIDGER et al., 1999; VAN OS et al., 2000), an CXCR4 eine schwache, partiell-agonistische Wirkung haben. Durch AMD3100 erhöhte sich das intrazelluläre Kalzium in Hefe- und Säugetierzellen proportional zur AMD-Konzentration. Möglicherweise spielt bei der Serum-Magnesiumerniedrigung diese agonistische Aktivität eine Rolle, so dass sich dessen Konzentration zugunsten des intrazellulären Magnesiumpools verschob. Gegen die partiell agonistische Wirkung als Grund für die Magnesiumerniedrigung spricht, dass sich der Kalziumspiegel im Serum nicht signifikant veränderte. In den Vorversuchen wurde zunächst ein geringer Abfall der Kalziumkonzentration im Serum ermittelt. Möglicherweise erhöhte sich nach AMD-Bindung an CXCR4 auch die Kalziumkonzentration in den Zellen. Kalzium unterliegt strengen physiologischen

Regelmechanismen und die Menge an ionisiertem Kalzium im Serum wird in einem engen Bereich konstant gehalten (NELSON und COUTO, 1998). Eine schnelle Mobilisierung von Kalzium aus den Knochen könnte mögliche Verluste im Serum ausgleichen, so dass ein anhaltender signifikanter Abfall der Serum-Kalziumkonzentration nach AMD-Gabe nicht auftritt. Die Messungen wurden alle zwei Wochen vor AMD-Gabe durchgeführt. Wäre die Messung kurz nach Injektion durchgeführt worden, hätte womöglich einen Einfluss von AMD3100 auf die Serum-Kalziumkonzentration gezeigt. In dieser Studie wurde die Erniedrigung des Serum-Magnesiums zum ersten Mal beschrieben, die Bedeutung dieser Beobachtung ist derzeit jedoch nicht klar. Magnesium liegt nur zu weniger als 1 % im Plasma vor und ist dort zu ca. 60 % an Proteine gebunden (GUYTON und HALL, 2000). Die Messung des ionisierten Magnesiums spiegelt daher nicht die wahren Magnesiumverhältnisse im Körper wider. Magnesium wird hauptsächlich über den Urin ausgeschieden. Daher wäre in zukünftigen Studien mit Bizyklen zusätzlich die Messung des Magnesiums im Urin wünschenswert, um mögliche Verluste ermitteln zu können.

2.2.2.2. Wirksamkeit

Die Körpermasse nahm in der AMD-Gruppe im Durchschnitt zu. Auch der Karnofsky-Index, der in dieser Gruppe zu Beginn schon sehr hoch lag, verbesserte sich und die Tiere der AMD-Gruppe zeigten am Ende den höchsten Wert; die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant. Von jeweils drei Tieren aus der AMD- und der AMD/PMEA-Gruppe berichteten die Besitzer nach der Therapie, dass die Tiere auffallend aufmerksam, aktiv und bewegungsfreudig waren, im Gegensatz zum vorher häufig gezeigten, ausgeprägten Schlafbedürfnis. Diese Steigerung des Wohlbefindens hielt bis zu zehn Monate nach Therapieende an.

Eine Verbesserung der immunologischen Parameter konnte mit AMD3100 nicht erreicht werden. Bei HIV-infizierten Mäusen (SCID-hu Thy/Liv mouse) konnte durch Therapie mit AMD3100 der Abfall des CD4/CD8-Quotienten signifikant verlangsamt werden (DATEMA et al., 1996). Dabei korrelierte der Unterschied mit Länge der Therapiedauer. Eventuell wären die Unterschiede durch eine längere Behandlung deutlicher geworden.

Eine statistisch signifikante Reduktion des relativen Provirus-Load wurde durch Therapie mit AMD3100 im Vergleich zur AMD/PMEA-Gruppe erzielt. Der

absolute Virus-Load fiel in der AMD-Gruppe ebenfalls ab. Die antivirale Wirksamkeit von AMD3100 wurde in mehreren Studien *in vitro* nachgewiesen; AMD3100 bewirkte eine Hemmung der Virus-Replikation von HIV oder FIV (ESTE et al., 1996; SCHOLS et al., 1997; EGBERINK et al., 1999; RICHARDSON et al., 1999; BLANCO et al., 2000). Bisher sind *in-vivo*-Daten über die antiretrovirale Wirkung von AMD3100 oder anderen Bizyklamen bei Tieren oder beim Menschen nicht zugänglich. Bei den Katzen dieser Untersuchung konnte anhand der Reduktion proviraler DNA eine deutliche antivirale Wirksamkeit von AMD3100 gegen FIV gezeigt werden.

AMD3100 hatte keinen Einfluss auf das rote Blutbild. Es wurde jedoch ein statistisch nicht signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl in der AMD-Gruppe gemessen. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten stieg unter AMD-Gabe ebenfalls an. Bei Menschen zeigte sich nach AMD-Gabe eine Erhöhung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und auch Monozyten (HENDRIX et al., 2000), und die Zahl hämatopoetischer Vorläuferzellen im peripheren Blut stieg an (AnorMED Produktinformation 2003, www.anormed.com/products/AMD-3100).

2.2.2.3. Resistenzentwicklung *in vivo*

In der vorliegenden Studie wurde keine Resistenzentwicklung des FIV *in vivo* gegen AMD3100 über einen Therapiezeitraum von sechs Wochen beobachtet. ESTE und Mitarbeiter (1996) konnten *in vitro* eine HIV-Resistenz gegen AMD3100 nach 20 bis 60 Zellkulturpassagen in Gegenwart des Bizyklams induzieren. Resistente Stämme zeigten Mutationen in der V3-Region des gp120 (DE VREESE et al., 1997). Bisher liegen keine klinischen Daten über die Resistenzentwicklung *in vivo* vor, jedoch wäre auch im Wirt eine Mutation oder ein Wechsel der Korezeptor-Verwendung möglich.

2.2.3. Kombinationstherapie

Die klinisch-chemischen Laborparameter änderten sich durch die Medikamentenkombination nicht. Die Erhöhung der Leberparameter AST, ALT und GLDH bei einem Tier kann nicht eindeutig als Organ-toxische Wirkung interpretiert werden.

Unter Therapie mit AMD3100 nahm der relative Provirus-Load im Vergleich zur Placebo-Gruppe statistisch signifikant ab. In Kombination mit PMEA wurde die Wirkung jedoch aufgehoben. Dieser gegenseitige Einfluss der Medikamente könnte möglicherweise durch die T-Zell-aktivierende Wirkung von PMEA bedingt sein. Latent infizierte T-Zellen könnten so zur Proliferation angeregt werden. Diese würden große Mengen infektiöser Viren produzieren und dadurch die Infektion weiterer Zellen ermöglichen. AMD3100 bindet kompetitiv an CXCR4, d. h. die Blockierung des Rezeptors wird durch die Höhe der AMD-Konzentration bestimmt. Das FIV konkurriert mit AMD3100 um den Rezeptor. Eine hohe Virus-Konzentration könnte daher die Wirkung des Bizyklams negativ beeinflussen.

VI. Zusammenfassung

In der Studie wurde die antiretrovirale Wirksamkeit des Bizyklams (1,1'-[1,4-phenylen-bis(methylen)]bis-1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan, (AMD3100) mit und ohne Kombination mit dem azyklischen Nukleosidphosphonat (*R*)-9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)-adenin (PMEA) untersucht. Um eine objektive Beurteilung zu gewährleisten, wurde die Untersuchung als placebokontrollierte Doppelblindstudie durchgeführt. 40 natürlich FIV-infizierte Katzen wurden randomisiert zu je zehn Tieren in die vier Gruppen „Placebo“, „AMD“, „PMEA“, oder „AMD/PMEA“ eingeteilt. Placebo oder die Substanzen AMD3100 (0,5 mg/kg KM) und PMEA (10 mg/kg KM) wurden den Katzen zweimal täglich bzw. zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von sechs Wochen subkutan injiziert.

Als Nebenwirkung des PMEA wurde ein statistisch signifikanter Abfall der Erythrozytenzahlen, des Hämoglobins und des Hämatokrits und der Anzahl neutrophiler Granulozyten verzeichnet. Unter Therapie mit PMEA wurde eine statistisch signifikante Besserung der Maulhöhlenentzündung erreicht.

AMD3100 zeigte klinisch keine Nebenwirkungen. Unter AMD-Gabe sank der Serum-Magnesiumspiegel statistisch signifikant, ohne dass klinische Symptome auftraten. Die Therapie mit AMD3100 bewirkte eine statistisch signifikante Abnahme des Provirus-Loads. AMD3100 zeigte eine deutliche antivirale Wirkung gegen FIV. Da die Nebenwirkungen medizinisch vertretbar waren, sollte seine Wirksamkeit über einen längeren Behandlungszeitraum untersucht werden.

Die Kombination beider Substanzen bedingte nicht mehr Nebenwirkungen als die Monotherapie. Bei den Katzen, die nur AMD3100 bekamen, sank der Provirus-Load, in der Kombination mit PMEA wurde jedoch keine Abnahme beobachtet. Möglicherweise wirkt die PMEA-induzierte Immunmodulation dem Wirkmechanismus des AMD3100 entgegen. Vielleicht wurde auch unter PMEA-Gabe die T-Zell-Aktivierung und Proliferation latent FIV-infizierter T-Zellen angeregt, und die AMD3100-Blockierung des CXCR4 war nicht mehr ausreichend, um die Infektion weiterer Zellen zu verhindern.

Summary

„Placebo-controlled double-blind treatment study in naturally Feline Immunodeficiency Virus-infected cats using the chemokine receptor inhibitor 1,1'-bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan (AMD3100)“

Antiretroviral efficacy of the bicyclam 1,1'-bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan (AMD3100) alone or in combination with the acyclic nucleoside phosphonate (*R*)-9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) was investigated. Forty naturally FIV-infected cats were treated for a period of 6 weeks in a placebo-controlled double-blind study. Patients were randomly classified into 4 treatment groups, “Placebo”, “AMD”, “PMEA”, and “AMD/PMEA”. Placebo or the compounds AMD3100 (0,5 mg/kg body weight) and PMEA (10 mg/kg body weight) were administered subcutaneously twice a day or twice a week, respectively.

Side effects of treatment with PMEA were a statistically significant decrease in the erythrocyte count, the hemoglobin concentration, the packed cell volume, and the number of neutrophil granulocytes. PMEA treatment caused a statistically significant improvement in the inflammation of the oral cavity.

AMD3100 showed no clinical side effects. Serum magnesium levels decreased statistically significant with AMD treatment without causing clinical sings. Cats in the AMD group showed a statistically significant decrease of the proviral load. Therefore, AMD3100 had a clear antiviral efficacy against FIV. Side effects were not causing clinical sings and the bicyclam should be tested over a longer treatment period.

Combination of both substances did not exacerbate side effects of either component. There was a decrease in proviral load in cats receiving only AMD3100 while no decrease was observed in combination with PMEA. PMEA-induced immunomodulation possibly inhibited the mechanism of action of AMD3100. T cell activation and proliferation of latently infected T cells were potentially stimulated during PMEA treatment leading to insufficient blockage of CXCR4 by AMD3100 that would prevent infection of additional cells.

VII. Literaturverzeichnis

Ahuja SK, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptors and molecular mimicry. *Immunol Today* 1994; 15: 281-7.

Ahuja SK, Lee JC, Murphy PM. CXC chemokines bind to unique sets of selectivity determinants that can function independently and are broadly distributed on multiple domains of human interleukin-8 receptor B. Determinants of high affinity binding and receptor activation are distinct. *J Biol Chem* 1996; 271: 225-32.

Aigner C. Vergleichende Untersuchung zum therapeutischen Langzeiteinsatz von azyklischen Nukleosidphosphonaten und Melittin bei natürlich FIV-infizierten Katzen. Diss. med. vet., München, 2000.

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994; 76: 853-64.

Aiyar A, Hindmarsh P, Skalka AM, Leis J. Concerted integration of linear retroviral DNA by the avian sarcoma virus integrase in vitro: dependence on both long terminal repeat termini. *J Virol* 1996; 70: 3571-80.

Albini A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, Proudfoot AE, Alouani S, Wells TN, Mariani G, Rabin RL, Farber JM, Noonan DM. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13153-8.

Alfano M, Schmidtmayerova H, Amella CA, Pushkarsky T, Bukrinsky M. The B-oligomer of pertussis toxin deactivates CC chemokine receptor 5 and blocks entry of M-tropic HIV-1 strains. *J Exp Med* 1999; 190: 597-605.

Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272: 1955-8.

Alkhatib G, Berger EA, Murphy PM, Pease JE. Determinants of HIV-1 coreceptor function on CC chemokine receptor 3. Importance of both extracellular and transmembrane/cytoplasmic regions. *J Biol Chem* 1997a; 272: 20420-6.

Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology* 1997b; 234: 340-8.

Alvarez V, Lopez Larrea C, Coto E. The chemokine receptors in HIV-1 infection and HIV-1 related disease progression. *Inmunologia* 1999; 18: 3-13.

Amara A, Gall SL, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, Baggiolini M, Virelizier JL, Arenzana Seisdedos F. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 1997; 186: 139-46.

Amara A, Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, Virelizier JL, Delepierre M, Baleux F, Lortat Jacob H, Arenzana Seisdedos F. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem* 1999; 274: 23916-25.

Ananworanich J, Lee Bang N, Gao H, Shearer WT, Reuben JM. Surface expression of CXCR4 and CCR5 on activated peripheral blood T lymphocytes and monocytes. In: Conference on Pediatric Research 2000: 14a.

Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, De Clercq E. Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol Res* 1998; 10: 523-31.

Annunziato F, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Manetti R, Maggi E, Romagnani S. Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 12-6.

Annunziato F, Cosmi L, Galli G, Beltrame C, Romagnani P, Manetti R, Romagnani S, Maggi E. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 691-9.

Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* 1999; 190: 1123-34.

Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, Shiraishi M, Aramaki Y, Okonogi K, Ogawa Y, Meguro K, Fujino M. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5698-703.

Bachmann MH, Mathiason DC, Learn GH, Rodrigo AG, Sodora DL, Mazzetti P, Hoover EA, Mullins JI. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: Dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *J Virol* 1997; 71: 4241-53.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55: 97-179.

Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 103-8.

Baggiolini M. New attack point in anti-HIV therapy discovered. Docking of viruses to human cells can be prevented. *Fortschr Med* 1997; 115: 48-50.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-8.

Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000; 21: 418-20.

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001; 250: 91-104.
Balzarini J, Naesens L, De Clercq E. Anti-retrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) in vivo increases when it is less frequently administered. *Int J Cancer* 1990; 46: 337-40.

Balzarini J, De Clercq E. 5-Phosphoribosyl 1-pyrophosphate synthetase converts the acyclic nucleoside phosphonates 9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine and 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine directly to their antivirally active diphosphate derivatives. *J Biol Chem* 1991; 266: 8686-9.

Balzarini J, Naesens L, Slachmuylders J, Niphuis H, Rosenberg I, Holy A, Schellekens H, De Clercq E. 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS* 1991; 5: 21-8.

Balzarini J, Vahlenkamp T, Egberink H, Hartmann K, Witvrouw M, Pannecouque C, Casara P, Nave JF, De Clercq E. Antiretroviral activities of acyclic nucleoside phosphonates [9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)guanine, (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine, and MDL 74,968] in cell cultures and murine sarcoma virus-infected newborn NMRI mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 611-6.

Barre Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Daugnet C, Cruest J, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzous C. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-71.

Bazan HA, Alkhatib G, Broder CC, Berger EA. Patterns of CCR5, CXCR4, and CCR3 usage by envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J Virol* 1998; 72: 4485-91.

Benson RE, Sanfridson A, Ottinger JS, Doyle C, Cullen BR. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med* 1993; 177: 1561-6.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999a; 17: 657-700.

Berger O, Gan X, Gujuluva C, Burns AR, Suler G, Stins M, Way D, Witte M, Weinand M, Said J, Kim KS, Taub D, Graves MC, Fiala M. CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia. *Mol Med* 1999b; 5: 795-805.

Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 1996; 70: 6288-95.

Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 1999; 94: 1899-905.

Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-33.

Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1925-30.

Braaten D, Franke EK, Luban J. Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol* 1996; 70: 3551-60.

Braley J. FeLV and FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. *Feline Practice* 1994; 22: 25-8.

Brambilla A, Villa C, Rizzardi G, Veglia F, Ghezzi S, Lazzarin A, Cusini M, Muratori S, Santagostino E, Gringeri A, Louie LG, Sheppard HW, Poli G, Michael NL, Pantaleo G, Vicenzi E. Shorter survival of SDF1-3'A/3'A homozygotes linked to CD4+ T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000; 182: 311-5.

Brandes M, Legler DF, Spoerri B, Schaerli P, Moser B. Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines. *Int Immunol* 2000; 12: 1285-92.

Brelot A, Heveker N, Pleskoff O, Sol N, Alizon M. Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol* 1997; 71: 4744-51.

Brelot A, Heveker N, Adema K, Hosie MJ, Willett B, Alizon M. Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *J Virol* 1999; 73: 2576-86.

Brelot A, Heveker N, Montes M, Alizon M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem* 2000; 275: 23736-44.

Bridger GJ, Skerlj RT, Padmanabhan S, Martellucci SA, Henson GW, Struyf S, Witvrouw M, Schols D, De Clercq E. Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-azamacrocycles that inhibit HIV-1 and HIV-2 replication by antagonism of the chemokine receptor CXCR4. *J Med Chem* 1999; 42: 3971-81.

Bridges CG, Taylor DL, Ahmed PS, Brennan TM, Hornsperger JM, Nave JF, Casara P, Tyns AS. MDL 74,968, a new acyclonucleotide analog: Activity against human immunodeficiency virus in vitro and in the hu-PBL-SCID.Beige mouse model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1072-7.

Broder CC, Collman RG. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 20-9.

Brown WC, Bissey L, Logan KS, Pedersen NC, Elder JH, Collisson EW. Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Virol* 1991; 65: 3359-64.

Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* 1999; 27: 1113-23.

Bruhl H, Wagner K, Kellner H, Schattenkirchner M, Schlondorff D, Mack M. Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 551-9.

Brumme ZL, Dong WW, Chan KJ, Hogg RS, Montaner JS, O'Shaughnessy MV, Harrigan PR. Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. *Aids* 2003; 17: 201-8.

Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, Stevenson M. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6580-4.

Cabrera C, Gutierrez A, Blanco J, Barretina J, Litovchick A, Lapidot A, Evdokimov AG, Clotet B, Este JA. Anti-human immunodeficiency virus activity of novel aminoglycoside-arginine conjugates at early stages of infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 627-34.

Cairns CM, Gordon JR, Li F, Baca-Estrada ME, Moyana T, Xiang J. Lymphotoxin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4+ and CD8+ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. *J Immunol* 2001; 167: 57-65.

Calabresi PA, Yun SH, Allie R, Whartenby KA. Chemokine receptor expression on MBP-reactive T cells: CXCR6 is a marker of IFN γ -producing effector cells. *J Neuroimmunol* 2002; 127: 96-105.

Calio R, Villani N, Balestra E, Sesa F, Holy A, Balzarini J, De Clercq E, Perno CF, Del Gobbo V. Enhancement of natural killer activity and interferon induction by different acyclic nucleoside phosphonates. *Antiviral Res* 1994; 23: 77-89.

Cammack N. Human immunodeficiency virus type 1 entry and chemokine receptors: A new therapeutic target. *Antivir Chem Chemother* 1999; 10: 53-62.

Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279: 381-4.

Caney SM, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Helps CR, Hirst TR, Stokes CR. Expression of chemokine receptors in the feline reproductive tract and large intestine. *J Comp Pathol* 2002; 126: 289-302.

Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 201-8.

Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; 93: 681-4.

Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D. Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 1999; 190: 1755-68.

Chen JD, Bai X, Yang AG, Cong Y, Chen SY. Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nat Med* 1997; 3: 1110-6.

Chen Z, Gettie A, Ho DD, Marx PA. Primary SIVsm isolates use the CCR5 coreceptor from sooty mangabeys naturally infected in West Africa: A comparison of coreceptor usage of primary SIVsm, HIV-2, and SIVmac. *Virology* 1998; 246: 113-24.

Cheng QJ, Lixin L, Krilis SA. Cells with features of mast cells and basophils. *Allergy Clin Immunol Int* 2001; 13: 197-203.

Choe H, Martin KA, Farzan M, Sodroski J, Gerard NP, Gerard C. Structural interactions between chemokine receptors, gp120 Env and CD4. *Semin Immunol* 1998; 10: 249-57.

Clements JE, Payne SL. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Virus Res* 1994; 32: 97-109.

Clements JE, Zink MC. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 100-17.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 1996; 2: 1244-7.

Coffin JM. HIV viral dynamics. *Aids* 1996; 10 Suppl 3: S75-84.

Cohen OJ, Vaccarezza M, Lam GK, Baird BF, Wildt K, Murphy PM, Zimmerman PA, Nutman TB, Fox CH, Hoover S, Adelsberger J, Baseler M, Arthos J, Davey RT, Jr., Dewar RL, Metcalf J, Schwartzentruber DJ, Orenstein JM, Buchbinder S, Saah AJ, Detels R, Phair J, Rinaldo C, Margolick JB, Fauci AS, et al. Heterozygosity for a defective gene for CC chemokine receptor 5 is not the sole determinant for the immunologic and virologic phenotype of HIV-infected long-term nonprogressors. *J Clin Invest* 1997; 100: 1581-9.

Cohen OJ, Paolucci S, Bende SM, Daucher M, Moriuchi H, Moriuchi M, Cicala C, Davey RT, Jr., Baird BF, Fauci AS. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphism in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: Lack of association with mutations other than CCR5-DELTA32. *J Virol* 1998; 72: 6215-7.

Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187: 2009-21.

Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 147-52.

Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* 1998; 273: 23799-804.

Courchamp F, Pontier D, Fromont E, Artois M. Impact of two feline retroviruses on natural populations of domestic cat. *Mammalia* 1995; 59: 589-98.

Courchamp F, Say L, Pontier D. Transmission of Feline Immunodeficiency Virus in a population of cats (*Felis catus*). *Wildlife Res* 2000; 27: 603-11.

Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark Lewis I. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 1997; 16: 6996-7007.

Cullen BR. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 375-94.

Daelemans D, Vandamme AM, De Clercq E. Human immunodeficiency virus gene regulation as a target for antiviral chemotherapy. *Antivir Chem Chemother* 1999; 10: 1-14.

Daelemans D, Schols D, Witvrouw M, Pannecouque C, Hatse S, van Dooren S, Hamy F, Klimkait T, de Clercq E, VanDamme AM. A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: inhibition of human immunodeficiency virus replication by blocking CXC-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 116-24.

Daniels GD, Zou J, Charlemagne J, Partula S, Cunningham C, Secombes CJ. Cloning of two chemokine receptor homologs (CXC-R4 and CC-R7) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 684-90.

Datema R, Rabin L, Hincenbergs M, Moreno MB, Warren S, Linquist V, Rosenwirth B, Seifert J, McCune JM. Antiviral efficacy in vivo of the anti-human immunodeficiency virus bicyclam SDZ SID 791 (JM 3100), an inhibitor of infectious cell entry. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 750-4.

Davis JL, Clements JE. Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 414-8.

De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Balzarini J, Witvrouw M, De Vreese K, Debyser Z, Rosenwirth B, Peichl P, et al. Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 668-74.

De Clercq E. Acyclic nucleoside phosphonates in the chemotherapy of DNA virus and retrovirus infections. *Intervirology* 1997; 40: 295-303.

De Clercq E. The emerging role of fusion inhibitors in HIV infection. *Drugs R D* 1999; 2: 321-31.

De Clercq E. Inhibition of HIV infection by bicyclams, highly potent and specific CXCR4 antagonists. *Mol Pharmacol* 2000a; 57: 833-9.

De Clercq E. CXCR4 and CCR5 chemokine receptor antagonists as anti-HIV agents, with special emphasis on the CXCR4 antagonist AMD-3100. *Curr Opin Anti Infect Invest Drugs* 2000b; 2: 226-36.

de Parseval A, Lerner DL, Borrow P, Willett BJ, Elder JH. Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J Virol* 1997; 71: 5742-9.

De Vreese K, Reymen D, Griffin P, Steinkasserer A, Werner G, Bridger Gary J, Este J, James W, Henson Geoffrey W, Desmyter J, Anne J, De Clercq E. The bicyclams, a new class of potent human immunodeficiency virus inhibitors, block viral entry after binding. *Antiviral Res* 1996; 29: 209-19.

De Vreese K, Van Nerum I, Vermeire K, Anne J, De Clercq E. Sensitivity of human immunodeficiency virus to bicyclam derivatives is influenced by the three-dimensional structure of gp120. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2616-20.

Del Gobbo V, Foli A, Balzarini J, De Clercq E, Balestra E, Villani N, Marini S, Perno CF, Calio R. Immunomodulatory activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA), a potent anti-HIV nucleotide analogue, on in vivo murine models. *Antiviral Res* 1991; 16: 65-75.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381: 661-6.

Dimitrov DS. Fusin--a place for HIV-1 and T4 cells to meet. *Nat Med* 1996; 2: 640-1.

Dimitrov DS. How do viruses enter cells? The HIV coreceptors teach us a lesson of complexity. *Cell* 1997; 91: 721-30.

Domachowske JB, Bonville CA, Gao JL, Murphy PM, Easton AJ, Rosenberg HF. The chemokine macrophage-inflammatory protein-1 alpha and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection. *J Immunol* 2000; 165: 2677-82.

Donath A. Einsatz der antientiviral wirksamen Dideoxynukleoside Zidovudin (AZT) und Phosphonylmethoxyladenin (PMEA) bei natürlich FIV-infizierten Katzen. Diss. med. vet., München, 1992.

Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 1998; 4: 72-7.

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85: 1149-58.

Doranz BJ, Berson JF, Rucker J, Doms RW. Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunol Res* 1997a; 16: 15-28.

Doranz BJ, Grovit Ferbas K, Sharron MP, Mao SH, Goetz MB, Daar ES, Doms RW, O'Brien WA. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J Exp Med* 1997b; 186: 1395-1400.

Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, Peiper SC, Brass LF, Doms RW. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J Virol* 1999; 73: 2752-61.

Dragic T, Moore JP. Functional analysis of CCR5; co-receptor for macrophage tropic HIV-1 strains. *J Leukoc Biol* 1997; 15: 15.

Dragic T, Trkola A, Thompson DAD, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, Lin SW, Ying W, Smith SO, Sakmar TP, Moore JP. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5639-44.

Dragic T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen Virol* 2001; 82: 1807-14.

Dumonceaux J, Nisole S, Chanel C, Quivet L, Amara A, Baleux F, Briand P, Hazan U. Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J Virol* 1998; 72: 512-9.

Dumont Drieux AM, De Parseval A, Heiber M, Salmon P, Pancino G, Sonigo P, Klatzmann D. Unusual amino acid sequence of the second Ig-like domain of the feline CD4 protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 1581-91.

Durig J, Schmucker U, Duhrsen U. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia* 2001; 15: 752-6.

Dutt P, Wang JF, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1 alpha and stem cell factor/kit ligand share signaling pathways in hemopoietic progenitors: a potential mechanism for cooperative induction of chemotaxis. *J Immunol* 1998; 161: 3652-8.

Earl CQ, Stadel JM, Anzano MA. Tumor necrosis factor-mediated biological activities involve a G-protein-dependent mechanism. *J Biol Response Mod* 1990a; 9: 361-7.

Earl PL, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990b; 87: 648-52.

Egberink H, Borst M, Niphuis H, Balzarini J, Neu H, Schellekens H, Clercq Ed, Horzinek M, Koolen M, De Clercq E. Suppression of feline immunodeficiency virus infection in vivo by 9-(2-phosphonomethoxyethyl) adenine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990a; 87: 3087-91.

Egberink H, Horzinek MC. Animal immunodeficiency viruses. *Vet Microbiol* 1992; 33: 311-31.

Egberink HF, Ederveen J, Montelaro RC, Pedersen NC, Horzinek MC, Koolen MJM. Intracellular proteins of feline immunodeficiency virus and their antigenic relationship with equine infectious anaemia virus proteins. *J Gen Virol* 1990b; 71: 739-43.

Egberink HF, Keldermans EJM, Koolen MJM, Horzinek MC. Humoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *Am J Vet Res* 1992; 53: 1133-8.

Egberink HF, De Clercq E, Van Vliet AL, Balzarini J, Bridger GJ, Henson G, Horzinek MC, Schols D. Bicyclams, selective antagonists of the human chemokine receptor CXCR4, potently inhibit feline immunodeficiency virus replication. *J Virol* 1999; 73: 6346-52.

Elder JH, Lerner DL, Hasselkus-Light CS, Fontenot DJ, Hunter E, Luciw PA, Montelaro RC, Phillips TR. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase. *J Virol* 1992; 66: 1791-4.

Elder JH, Phillips TR. Molecular properties of feline immunodeficiency virus (FIV). *Infect Agents Dis* 1993; 2: 361-74.

Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998; 280: 1880-4.

Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stoebeu Haggarty B, Choe S, Vance PJ, Wells TNC, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, Hoxie JA. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by Fusin/CXCR4. *Cell* 1996; 87: 745-56.

Engel BC, Bauer G, Pepper KA, Bockstoe DC, Yu XJ, Chen SY, Kohn DB. Intrakines--evidence for a trans-cellular mechanism of action. *Mol Ther* 2000; 1: 165-70.

English RV, Nelson P, Johnson CM, Nasisse M, Tompkins WA, Tompkins MB. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994; 170: 543-52.

Este JA, De Vreese K, Witvrouw M, Schmit JC, Vandamme AM, Anne J, Desmyter J, Henson GW, Bridger G, De Clercq E. Antiviral activity of the bicyclam derivative JM3100 against drug-resistant strains of human immunodeficiency virus type 1. *ANTIVIRAL RES* 1996; 29: 297-307.

Este JA. Sch-351125 and Sch-350634. Schering-Plough. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 379-83.

Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S. Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* 1999; 94: 875-83.

Farzan M, Babcock GJ, Vasilieva N, Wright PL, Kiprilov E, Mirzabekov T, Choe H. The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry. *J Biol Chem* 2002; 277: 29484-9.

Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debre P, Theodorou I, Combadiere C. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 2000; 287: 2274-7.

Favorova OO, Andreewski TV, Boiko AN, Sudomoina MA, Alekseenkov AD, Kulakova OG, Slanova AV, Gusev EI. The chemokine receptor CCR5 deletion mutation is associated with MS in HLA-DR4-positive Russians. *Neurology* 2002; 59: 1652-5.

Feil C, Augustin HG. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 38-45.

Feldman BF, Ruehl WW. Interpreting absolute WBC counts. *Mod Vet Pract* 1984; 65: 446-9.

Felsburg PJ. Overview of the immune system and immunodeficiency diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1994; 24: 629-53.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-7.

Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1987; 317: 185-91.

Fischl MA, Richman DD, Hansen N, Collier AC, Carey JT, Para MF, Hardy WD, Dolin R, Powderly WG, Allan JD, et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group. *Ann Intern Med* 1990; 112: 727-37.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press, 2000, 804.

Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996; 87: 1037-47.

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33.

Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* 1997; 139: 1349-60.

Frey SCS, Hoover EA, Mullins JI. Feline immunodeficiency virus cell entry. *J Virol* 2001; 75: 5433-40.

Frodl R, Gierschik P, Moepps B. Genomic organization and expression of the CXCR4 gene in mouse and man: absence of a splice variant corresponding to mouse CXCR4-B in human tissues. *J Recept Signal Transduct Res* 1998; 18: 321-44.

Fujii N, Nakashima H, Tamamura H. The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 185-95.

Fujisawa T, Kato Y, Nagase H, Atsuta J, Terada A, Iguchi K, Kamiya H, Morita Y, Kitaura M, Kawasaki H, Yoshie O, Hirai K. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 2000; 106: 507-513.

Gallo RC, Lusso P. Chemokines and HIV infection. *Curr Opin Infect Dis* 1997; 10: 12-17.

Gao JL, Wynn TA, Chang Y, Lee EJ, Broxmeyer HE, Cooper S, Tiffany HL, Westphal H, Kwon-Chung J, Murphy PM. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med* 1997; 185: 1959-68.

Garcia JV, Alfano J, Miller AD. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol* 1993; 67: 1511-6.

Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-15.

Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 14153-60.

Gilbert JM, Hernandez LD, Balliet JW, Bates P, White JM. Receptor-induced conformational changes in the subgroup A avian leukosis and sarcoma virus envelope glycoprotein. *J Virol* 1995; 69: 7410-5.

Gong W, Howard OM, Turpin JA, Grimm MC, Ueda H, Gray PW, Raport CJ, Oppenheim JJ, Wang JM. Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry/replication. *J Biol Chem* 1998; 273: 4289-92.

Greene WK, Meers J, Fierro Gd, Carnegie PR, Robinson WF, Del Fierro G. Extensive sequence variation of feline immunodeficiency virus env genes in isolates from naturally infected cats. *Arch Virol* 1993; 133: 1-2.

Grivel JC, Ito Y, Faga G, Santoro F, Shaheen F, Malnati MS, Fitzgerald W, Lusso P, Margolis L. Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med* 2001; 7: 1232-5.

Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Valentine FT, Jonas L, Meibohm A, Emini EA, Chodakewitz JA. Treatment with zidovudine, zalcitabine, and didanosine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997; 337: 734-9.

Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998; 391: 799-803.

Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1998a; 273: 4282-7.

Gupta SK, Pillarisetti K, Gray SL, Stadel JM. Molecular cloning of a novel chemokine receptor-like gene from early stage chick embryos. *Biochem Mol Biol Int* 1998b; 44: 673-81.

Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia 2000, 1064.

Hamy F, Felder ER, Heizmann G, Lazdins J, Aboul-ela F, Varani G, Karn J, Klimkait T. An inhibitor of the Tat/TAR RNA interaction that effectively suppresses HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3548-53.

Hamy F, Gelus N, Zeller M, Lazdins JL, Bailly C, Klimkait T. Blocking HIV replication by targeting Tat protein. *Chem Biol* 2000; 7: 669-76.

Han Y, Wang J, He T, Ransohoff RM. TNF-alpha down-regulates CXCR4 expression in primary murine astrocytes. *Brain Res* 2001; 888: 1-10.

Harley R, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ. Salivary and serum immunoglobulin levels in cats with chronic gingivostomatitis. *Vet Rec* 2003; 152: 125-9.

Hartmann K, Hinze K. Epidemiologie und Klinik der FIV-Infektion in Bayern. *Tierarztl Prax* 1991; 19: 545-51.

Hartmann K, Donath A, Beer B, Egberink HF, Horzinek MC, Lutz H, Hoffmann Fezer G, Thum I, Thefeld S. Use of two virustatica (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 35: 1-2.

Hartmann K, Balzarini J, Higgins J, Clercq Ed, Pedersen NC, De Clercq E. In vitro activity of acyclic nucleoside phosphonate derivatives against feline immunodeficiency virus in Crandell feline kidney cells and feline peripheral blood lymphocytes. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1994; 5: 13-19.

Hartmann K. Entwicklung eines Testsystems zur Erprobung neuer Medikamente gegen die FIV-Infektion der Katze als Modell für die Behandlung erworbener Immunschwächesyndrome. *Habil med vet*, München, 1995.

Hartmann K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet J* 1998; 155: 123-37.

Hartmann K, Kuffer M. Karnofsky's score modified for cats. *Eur J Med Res* 1998; 3: 95-8.

Haschek WM, Weigel RM, Scherba G, DeVera MC, Feinmehl R, Solter P, Tompkins MB, Tompkins WA. Zidovudine toxicity to cats infected with feline leukemia virus. *Fundam Appl Toxicol* 1990; 14: 764-75.

Hatse S, Princen K, Gerlach LO, Bridger G, Henson G, De Clercq E, Schwartz Thue W, Schols D. Mutation of Asp171 and Asp262 of the chemokine receptor CXCR4 impairs its coreceptor function for human immunodeficiency virus-1 entry and abrogates the antagonistic activity of AMD3100. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 164-73.

Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E, Schols D. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett* 2002; 527: 255-62.

He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 1997; 385: 645-9.

Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD, Mackay CR. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1997; 99: 178-84.

Heesen M, Berman MA, Hopken UE, Gerard NP, Dorf ME. Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1 α is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms. *J Immunol* 1997; 158: 3561-4.

Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC, 2nd, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW, Jr., Arthur LO, Bryant DK, Fenselau C. Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol* 1992; 66: 1856-65.

Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, Giandomenico C, Fuchs EJ, Redpath E, Bridger G, Henson GW. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1667-73.

Hesselgesser J, Halks Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, Taub D, Horuk R. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* 1997; 7: 112-21.

Heuer TS, Brown PO. Photo-cross-linking studies suggest a model for the architecture of an active human immunodeficiency virus type 1 integrase-DNA complex. *Biochemistry* 1998; 37: 6667-78.

Heveker N, Montes M, Germeroth L, Amara A, Trautmann A, Alizon M, Schneider Mergener J. Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides. *Curr Biol* 1998; 8: 369-76.

Heveker N, Tissot M, Thuret A, Schneider Mergener J, Alizon M, Roch M, Marullo S. Pharmacological properties of peptides derived from stromal cell-derived factor 1: study on human polymorphonuclear cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 1418-25.

Hoffman TL, Stephens EB, Narayan O, Doms RW. HIV type I envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11360-5.

Hoffman TL, LaBranche CC, Zhang W, Canziani G, Robinson J, Chaiken I, Hoxie JA, Doms RW. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 6359-64.

Hoffmann-Fezer G, Thum I, Ackley C, Mysliwietz J, Hartmann K, Kraft W. T-lymphocyte subpopulations in FIV-positive and -negative cats. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 1990; 132: 24-27.

Hoffmann-Fezer G, Thum I, Ackley C, Mysliwietz J, Hartmann K, Kraft W. Subpopulations of T-helper and T-suppressor lymphocytes in peripheral blood from cats positive for feline immunodeficiency virus. *Tierarztl Prax* 1991; 19: 682-6.

Hoffmann-Fezer G, Thum J, Ackley C, Herbold M, Mysliwietz J, Thefeld S, Hartmann K, Kraft W. Decline in CD4⁺ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1992; 66: 1484-8.

Hoffmann-Fezer G, Mortelbauer W, Hartmann K, Mysliwietz J, Thefeld S, Beer B, Thum I, Kraft W. Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. *Res Vet Sci* 1996; 61: 222-6.

Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, Leutenegger CM, Lutz H, McClure HM, Ruprecht RM. Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one- versus two-enzyme systems. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1247-57.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' \rightarrow 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 7276-80.

Homey B, Wang W, Soto H, Buchanan ME, Wiesenborn A, Catron D, Muller A, McClanahan TK, Dieu-Nosjean MC, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Oldham E, Zlotnik A. Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol* 2000; 164: 3465-70.

Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, McEvoy L, Lauerma AI, Assmann T, Bunemann E, Lehto M, Wolff H, Yen D, Marxhausen H, To W, Sedgwick J, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 2002; 8: 157-65.

Hoover EA, Ebner JP, Zeidner NS, Mullins JI. Early therapy of feline leukemia virus infection (FeLV-FAIDS) with 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl)adenine (PMEA). *Antiviral Res* 1991; 16: 77-92.

Hoover EA, Philpott MS, Ebner JP, Zeidner NS. Experimental therapy of immunodeficiency-inducing feline retroviruses with phosphonylmethoxyethyl adenine (PMEA). *Antiviral Res* 1992; 17: 131.

Hori T, Sakaida H, Sato A, Nakajima T, Shida H, Yoshie O, Uchiyama T. Detection and delineation of CXCR-4 (fusin) as an entry and fusion cofactor for T-tropic [correction of T cell-tropic] HIV-1 by three different monoclonal antibodies. *J Immunol* 1998; 160: 180-8.

Hosie MJ, Robertson C, Jarrett O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 1989; 125: 293-7.

Hosie MJ, Willett BJ, Dunsford TH, Jarrett O, Neil JC. A monoclonal antibody which blocks infection with feline immunodeficiency virus identifies a possible non-CD4 receptor. *J Virol* 1993; 67: 1667-71.

Howard OMZ, Korte T, Tarasova NI, Grimm M, Turpin JA, Rice WG, Michejda CJ, Blumenthal R, Oppenheim JJ. Small molecule inhibitor of HIV-1 cell fusion blocks chemokine receptor-mediated function. *J Leukocyte Biol* 1998a; 64: 6-13.

Howard OMZ, Oppenheim JJ, Hollingshead MG, Covey JM, Bigelow J, McCormack JJ, Buckheit RW, Jr., Clanton DJ, Turpin JA, Rice WG. Inhibition of in vitro and in vivo HIV replication by a distamycin analogue that interferes with chemokine receptor function: A candidate for chemotherapeutic and microbicidal application. *J Med Chem* 1998b; 41: 2184-93.

Hoxie JA, LaBranche CC, Endres MJ, Turner JD, Berson JF, Doms RW, Matthews TJ. CD4-independent utilization of the CXCR4 chemokine receptor by HIV-1 and HIV-2. *J Reprod Immunol* 1998; 41: 197-211.

Huang H, Li F, Cairns CM, Gordon JR, Xiang J. Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 378-82.

Huang H, Li F, Gordon JR, Xiang J. Synergistic enhancement of antitumor immunity with adoptively transferred tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells and intratumoral lymphotactin transgene expression. *Cancer Res* 2002; 62: 2043-51.

Hudak S, Hagen M, Liu Y, Catron D, Oldham E, McEvoy LM, Bowman EP. Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells. *J Immunol* 2002; 169: 1189-96.

Ignatius R, Wei Y, Beaulieu S, Gettie A, Steinman Ralph M, Pope M, Mojsov S. The immunodeficiency virus coreceptor, Bonzo/STRL33/TYMSTR, is expressed by macaque and human skin- and blood-derived dendritic cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1055-9.

Iikura M, Miyamasu M, Yamaguchi M, Kawasaki H, Matsushima K, Kitaura M, Morita Y, Yoshie O, Yamamoto K, Hirai K. Chemokine receptors in human basophils: inducible expression of functional CXCR4. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 113-20.

Iizawa Y, Kanzaki N, Takashima K, Miyake H, Tagawa Y, Sugihara Y, Baba M. Anti-HIV-1 Activity of TAK-220, a Small Molecule CCR5 Antagonist. In: 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston 2003: 1.

Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 1997a; 272: 15036-42.

Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997b; 91: 521-30.

Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 2001; 97: 367-75.

Inoshima Y, Miyazawa T, Mikami T. The roles of vif and ORF-A genes and AP-1 binding site in in vivo replication of feline immunodeficiency virus. *Arch Virol* 1998a; 143: 789-95.

Inoshima Y, Miyazawa T, Mikami T. In vivo functions of the auxiliary genes and regulatory elements of feline immunodeficiency virus. *Vet Microbiol* 1998b; 60: 2-4.

Kamp W, Schokker J, Cambridge E, De Jong S, Schuurman R, De Groot T, Boucher CA. Effect of weekly adefovir (PMEA) infusions on HIV-1 virus load: results of a phase I/II study. *Antivir Ther* 1999; 4: 101-7.

Kanbe K, Shimizu N, Soda Y, Takagishi K, Hoshino H. A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2. *Virology* 1999; 265: 264-73.

Karnofsky D, Abelmann W, Craver L, Burchenal J. The use of nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. *Cancer* 1948: 634-56.

Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 133-73.

Kelepouris E, Agus ZS. Hypomagnesemia: renal magnesium handling. *Semin Nephrol* 1998; 18: 58-73.

Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, Zlotnik A. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994; 266: 1395-99.

Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest* 2001; 107: 595-601.

Kim CH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 2002; 100: 11-6.

Klasse PJ, Rosenkilde Mette M, Signoret N, Pelchen Matthews A, Schwartz Thue W, Marsh M. CD4-chemokine receptor hybrids in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73: 7453-66.

Klasse R, Wilkinson D, Clapham PR, Pelchen Matthews A, Power C, Wells TNC, Kim J, Peiper SC, Hoxie JA, Marsh M. Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J Virol* 1997; 71: 8405-15.

Klein D, Janda P, Steinborn R, Muller M, Salmons B, Gunzburg WH. Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *Electrophoresis* 1999; 20: 291-9.

Klein D, Leutenegger CM, Bahula C, Gold P, Hofmann-Lehmann R, Salmons B, Lutz H, Gunzburg WH. Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26: 8-20.

Koolen M, Egberink H, Schellekens H, Horzinek MC. Feline immunodeficiency virus (FIV): a model for antiviral chemotherapy. In: *Animal Models in AIDS: International TNO meeting*, Maastricht, Netherlands 1989.

Kovacs EM, Baxter GD, Robinson WF. Feline peripheral blood mononuclear cells express message for both CXC and CC type chemokine receptors. *Arch Virol* 1999; 144: 273-85.

Kuffer M, Balzarini J, Rolinski B, Goebel F, Erfle V, Goldberg M, Hartmann K. Vergleichende Untersuchung über die Wirksamkeit zweier Nukleosidanaloga bei FIV-infizierten Katzen. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* 1997; 25: 671-7.

Kurt RA, Bauck M, Harma S, McCulloch K, Baher A, Urba WJ. Role of C chemokine lymphotactin in mediating recruitment of antigen-specific CD62L(lo) cells in vitro and in vivo. *Cell Immunol* 2001; 209: 83-8.

Labrosse B, Brelot A, Heveker N, Schols D, De Clercq E, Alizon M. Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J Virol* 1998; 72: 6381-8.

Lalani AS, Masters J, Zeng W, Barrett J, Pannu R, Everett H, Arendt CW, McFadden G. Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science* 1999; 286: 1968-71.

Lavi E, Strizki JM, Ulrich AM, Zhang W, Fu L, Wang Q, O'Connor M, Hoxie JA, Gonzalez Scarano F. CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types, including microglia and neurons. *Am J Pathol* 1997; 151: 1035-42.

Lazarini F, Casanova P, Tham TN, De Clercq E, Arenzana Seisdedos F, Baleux F, Dubois Dalcq M. Differential signalling of the chemokine receptor CXCR4 by stromal cell-derived factor 1 and the HIV glycoprotein in rat neurons and astrocytes. *EUR J NEUROSCI* 2000; 12: 117-125.

Lee B, Doranz BJ, Ratajczak MZ, Doms RW. An intricate web: Chemokine receptors, HIV-1 and hematopoiesis. *Stem Cells* Miamisburg 1998; 16: 79-88.

Lee B, Sharron M, Blanpain C, Doranz BJ, Vakili J, Setoh P, Berg E, Liu G, Guy HR, Durell SR, Parmentier M, Chang CN, Price K, Tsang M, Doms RW. Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. *J Biol Chem* 1999; 274: 9617-26.

Lee S, Tiffany HL, King L, Murphy PM, Golding H, Zaitseva MB. CCR8 on human thymocytes functions as a human immunodeficiency virus type 1 coreceptor. *J Virol* 2000; 74: 6946-52.

Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* 1998; 187: 655-60.

Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993; 57: 183-289.

Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994; 68: 510-6.

Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995; 182: 1301-14.

Liao F, Alkhatib G, Peden Keith WC, Sharma G, Berger Edward A, Farber Joshua M. STRL33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 1997; 185: 2015-23.

Liao Z, Cimasky Lisa M, Hampton R, Nguyen Dzung H, Hildreth James EK. Lipid rafts and HIV pathogenesis: Host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1009-19.

Lin CL, Suri RM, Rahdon RA, Austyn JM, Roake JA. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4114-22.

Lin G, Baribaud F, Romano J, Doms RW, Hoxie JA. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol* 2003; 77: 931-42.

Linenberger ML, Deng T. The effects of feline retroviruses on cytokine expression. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 343-68.

LiWang AC, Cao JJ, Zheng H, Lu Z, Peiper SC, LiWang PJ. Dynamics study on the anti-human immunodeficiency virus chemokine viral macrophage-inflammatory protein-II (VMIP-II) reveals a fully monomeric protein. *Biochemistry* 1999; 38: 442-53.

Locati M, Murphy PM. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 1999; 50: 425-40.

Lodge RE, Darlix JL, Cohen EA. HIV infection: The viral factors. *M S Medecine Sciences* 1998; 14: 148-54.

Loetscher M, Amara A, Oberlin E, Brass N, Legler DF, Loetscher P, M DA, Meese E, Rousset D, Virelizier JL, Baggiolini M, Arenzana Seisdedos F, Moser B. TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Curr Biol* 1997; 7: 652-60.

Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 1998a; 28: 3696-705.

Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998b; 391: 344-5.

Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 2000; 74: 127-80.

Lombardi S, Garzelli C, La Rosa C, Zaccaro L, Specter S, Malvaldi G, Tozzini F, Esposito F, Bendinelli M. Identification of a linear neutralization site within the third variable region of the feline immunodeficiency virus envelope. *J Virol* 1993; 67: 4742-9.

Lombardi S, Massi C, Tozzini F, Zaccaro L, Bazzichi A, Bandecchi P, La Rosa C, Bendinelli M, Garzelli C. Epitope mapping of the V3 domain of feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein by monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1995; 76: 1893-9.

Lopalco L, Barassi C, Pastori C, Longhi R, Burastero SE, Tambussi G, Mazzotta F, Lazzarin A, Clerici M, Siccardi AG. CCR5-reactive antibodies in seronegative partners of HIV-seropositive individuals down-modulate surface CCR5 in vivo and neutralize the infectivity of R5 strains of HIV-1 In vitro. *J Immunol* 2000; 164: 3426-33.

Luban J. Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* 1996; 87: 1157-9.

Lusso P. Chemokines and viruses: The dearest enemies. *Virology* 2000; 273: 228-40.

Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-45.

Maeda K, Yoshimura K, Shibayama S, Habashita H, Tada H, Sagawa K, Miyakawa T, Aoki M, Fukushima D, Mitsuya H. Novel low molecular weight spirodiketopiperazine derivatives potently inhibit R5 HIV-1 infection through their antagonistic effects on CCR5. *J Biol Chem* 2001; 276: 35194-200.

Maki W, Morales RE, Carroll VA, Telford WG, Knibbs RN, Stoolman LM, Hwang ST. CCR6 colocalizes with CD18 and enhances adhesion to activated endothelial cells in CCR6-transduced Jurkat T cells. *J Immunol* 2002; 169: 2346-53.

Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989; 338: 254-7.

Margulies BJ, Hauer DA, Clements JE. Identification and comparison of eleven rhesus macaque chemokine receptors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 981-6.

Marmor M, Sheppard HW, Donnell D, Bozeman S, Celum C, Buchbinder S, Koblin B, Seage GR, 3rd. Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 27: 472-81.

Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXCR4 chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 2000; 1: 298-304.

McKnight A, Wilkinson D, Simmons G, Talbot SJ, Picard L, Ahuja M, Marsh M, Hoxie JA, Clapham PR. Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *J Virol* 1997; 71: 1692-6.

McManus CM, Weidenheim K, Woodman SE, Nunez J, Hesselgesser J, Nath A, Berman JW. Chemokine and chemokine-receptor expression in human glial elements: Induction by the HIV protein, Tat, and chemokine autoregulation. *Am J Pathol* 2000; 156: 1441-53.

Meister S, Otto C, Papkalla A, Krumbiegel M, Pohlmann S, Kirchhoff F. Basic amino acid residues in the V3 loop of simian immunodeficiency virus envelope alter viral coreceptor tropism and infectivity but do not allow efficient utilization of CXCR4 as entry cofactor. *Virology* 2001; 284: 287-96.

Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-70.

Miller R, Cairns JS, Bridges S, Sarver N. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J Virol* 2000; 74: 7187-95.

Miyazaki K, Inoue H, Onai N, Ishihara H, Kanno M. Chemokine-mediated thymopoiesis is regulated by a mammalian Polycomb group gene, *mel-18*. *Immunol Lett* 2002; 80: 139-43.

Miyazawa T, Fukasawa M, Hasegawa A, Maki N, Ikuta K, Takahashi E, Hayami M, Mikami T. Molecular cloning of a novel isolate of feline immunodeficiency virus biologically and genetically different from the original US isolate. *J Virol* 1991; 65: 1572-7.

Miyazawa T, Kohmoto M, Kawaguchi Y, Tomonaga K, Toyosaki T, Ikuta K, Adachi A, Mikami T. The AP-1 binding site in the feline immunodeficiency virus long terminal repeat is not required for virus replication in feline T lymphocytes. *J Gen Virol* 1993; 74: 1573-80.

Miyazawa T, Mikami T. Biological nature of feline immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 519-26.

Miyazawa T, Tomonaga K, Kawaguchi Y, Mikami T. The genome of feline immunodeficiency virus. *Arch Virol* 1994; 134: 221-34.

Mohle R, Bautz F, Denzlinger C, Kans L, Broxmeyer HE, Moore MAS. Transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: Role of chemotactic factors. *Ann New York Acad Sci* 2001; 938: 26-35.

Moore JP. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 1997; 276: 51-2.

Moore MA. The role of chemoattraction in cancer metastases. *Bioessays* 2001; 23: 674-6.

Morikawa S, Lutz H, Aubert A, Bishop DH. Identification of conserved and variable regions in the envelope glycoprotein sequences of two feline immunodeficiency viruses isolated in Zurich, Switzerland. *Virus Res* 1991; 21: 53-63.

Morikawa S, Bishop DH. Identification and analysis of the gag-pol ribosomal frameshift site of feline immunodeficiency virus. *Virology* 1992; 186: 389-97.

Morohashi H, Miyawaki T, Nomura H, Kuno K, Murakami S, Matsushima K, Mukaida N. Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 180-7.

Mosier DE, Picchio GR, Gulizia RJ, Sabbe R, Poignard P, Picard L, Offord RE, Thompson DA, Wilken J. Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J Virol* 1999; 73: 3544-50.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-6.

Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, Craig FE, O'Connell P, Tryon V, Clark RA, Dolan MJ, Ahuja SK. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* 1998; 4: 786-93.

Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, Yoshida N, Waki M, Matsumoto A, Yoshie O, Kishimoto T, Yamamoto N, Nagasawa T. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* 1997; 186: 1389-93.

Murakami T, Zhang TY, Koyanagi Y, Tanaka Y, Kim J, Suzuki Y, Minoguchi S, Tamamura H, Waki M, Matsumoto A, Fujii N, Shida H, Hoxie JA, Peiper SC, Yamamoto N. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73: 7489-96.

Murphy PM. Molecular piracy of chemokine receptors by herpesviruses. *Infect Agents Dis* 1994; 3: 137-54.

Murphy PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol* 1997; 34: 311-8.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145-76.

Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 227-9.

Naesens L, Balzarini J, De Clercq E. Single-dose administration of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) and 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine (PMEDAP) in the prophylaxis of retrovirus infection in vivo. *Antiviral Res* 1991; 16: 53-64.

Naesens L, Neyts J, Balzarini J, Holy A, Rosenberg I, De-Clercq E. Efficacy of oral 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine (PMEDAP) in the treatment of retrovirus and cytomegalovirus infections in mice. *J Med Virol* 1993; 39: 167-72.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382: 635-8.

Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Kawasaki H, Ohta K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 29-32.

Nakagaki K, Nakagaki K, Takahashi K, Schols D, De Clercq E, Tabira T. CXCR4 is the primary receptor for feline immunodeficiency virus in astrocytes. *J Neurovirol* 2001; 7: 487-92.

Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol* 2003; 170: 1136-40.

Nanki T, Lipsky PE. Lack of correlation between chemokine receptor and Th1/Th2 cytokine expression by individual memory T cells. *Int Immunol* 2000; 12: 1659-67.

Nanki T, Nagasaka K, Hayashida K, Saita Y, Miyasaka N. Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2001; 167: 5381-5.

Nanki T, Imai T, Nagasaka K, Urasaki Y, Nonomura Y, Taniguchi K, Hayashida K, Hasegawa J, Yoshie O, Miyasaka N. Migration of CX3CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2878-83.

Nardelli B, Tiffany HL, Bong GW, Yourey PA, Morahan DK, Li Y, Murphy PM, Alderson RF. Characterization of the signal transduction pathway activated in human monocytes and dendritic cells by MPIF-1, a specific ligand for CC chemokine receptor 1. *J Immunol* 1999; 162: 435-44.

Nassal M, Rieger A, Steinau O. Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. *J Mol Biol* 1992; 225: 1013-25.

Nelson RW, Couto CG. *Small Animal Internal Medicine*, 1998, 1417.

Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB, Graham GJ. Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. *J Biol Chem* 1997a; 272: 12495-504.

Nibbs RJ, Wylie SM, Yang J, Landau NR, Graham GJ. Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6. *J Biol Chem* 1997b; 272: 32078-83.

Nilsson G, Mikovits JA, Metcalfe DD, Taub DD. Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. *Blood* 1999; 93: 2791-7.

Norimine J, Miyazawa T, Kawaguchi Y, Tomonaga K, Shina YS, Toyosaki T, Kohmoto M, Niikura M, Tohya Y, Mikami T. Feline CD4 molecules expressed on feline non-lymphoid cell lines are not enough for productive infection of highly lymphotropic feline immunodeficiency virus isolates. *Arch Virol* 1993; 130: 171-8.

Novotney C, English RV, Housman J, Davidson MG, Nasisse MP, Jeng CR, Davis WC, Tompkins MB. Lymphocyte Population Changes in Cats Naturally Infected With Feline Immunodeficiency Virus. *AIDS London* 1990; 4: 1213-8.

Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382: 833-5.

O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* 2000; 177: 99-111.

O'Brien WA, Sumner-Smith M, Mao SH, Sadeghi S, Zhao JQ, Chen IS. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of an oligocationic compound mediated via gp120 V3 interactions. *J Virol* 1996; 70: 2825-31.

Ochi H, Hirani WM, Yuan Q, Friend DS, Austen KF, Boyce JA. T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med* 1999; 190: 267-80.

Olmsted RA, Barnes AK, Yamamoto JK, Hirsch VM, Purcell RH, Johnson PR. Molecular Cloning of Feline Immunodeficiency Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989a; 86: 2448-52.

Olmsted RA, Hirsch VM, Purcell RH, Johnson PR. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: Genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989b; 86: 8088-92.

Olson WC, Rabut GE, Nagashima KA, Tran DN, Anselma DJ, Monard SP, Segal JP, Thompson DA, Kajumo F, Guo Y, Moore JP, Maddon PJ, Dragic T. Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5. *J Virol* 1999; 73: 4145-55.

Otova B, Zidek Z, Holy A, Votruba I, Sladka M, Marinov I, Leskova V. Antitumor activity of novel purine acyclic nucleotide analogs PMEA and PMEDAP. *In Vivo* 1997; 11: 163-7.

Pancino G, Fossati I, Chappey C, Castellet S, Hurtrel B, Moraillon A, Klatzmann D, Sonigo P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 1993; 192: 659-62.

Pantaleo G, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Fauci AS. Antiviral immunity in HIV-1 infected long-term non-progressors (LTNPs). *Semin Virol* 1996; 7: 131-8.

Parent LJ, Bennett RP, Craven RC, Nelle TD, Krishna NK, Bowzard JB, Wilson CB, Puffer BA, Montelaro RC, Wills JW. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol* 1995; 69: 5455-60.

Paroli M, Propato A, Accapezzato D, Francavilla V, Schiaffella E, Barnaba V. The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view. *Immunol Lett* 2001; 79: 127-9.

Paterlini MG. Structure Modeling of the Chemokine Receptor CCR5: Implications for Ligand Binding and Selectivity. *Biophys J* 2002; 83: 3012-31.

Pease JE, Murphy PM. Microbial corruption of the chemokine system: an expanding paradigm. *Semin Immunol* 1998; 10: 169-78.

Pease JE, Wang J, Ponath PD, Murphy PM. The N-terminal extracellular segments of the chemokine receptors CCR1 and CCR3 are determinants for MIP-1 α and eotaxin binding, respectively, but a second domain is essential for efficient receptor activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 19972-6.

Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 1987; 235: 790-3.

Pedersen NC, Yamamoto JK, Ishida T, Hansen H. Feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 21: 111-29.

Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2002; 169: 6673-6.

Phillips TR, Lamont C, Konings DA, Shacklett BL, Hamson CA, Luciw PA, Elder JH. Identification of the Rev transactivation and Rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1992; 66: 5464-71.

Philpott MS, Ebner JP, Hoover EA. Evaluation of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine therapy for feline immunodeficiency virus using a quantitative polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; 35: 155-66.

Poeschla EM, Looney DJ. CXCR4 is required by a nonprimate lentivirus: heterologous expression of feline immunodeficiency virus in human, rodent, and feline cells. *J Virol* 1998; 72: 6858-66.

Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 1996; 2: 1174-8.

Princen K, Hatse S, Vermeire K, De Clercq E, Schols D. Evaluation of SDF-1/CXCR4-induced Ca²⁺ signaling by fluorometric imaging plate reader (FLIPR) and flow cytometry. *Cytometry* 2003; 51A: 35-45.

Psenak O. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). Jeho struktura a funkce. *Cas Lek Cesk* 2001; 140: 355-63.

Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998; 101: 746-54.

Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Gonzalez-Canali G, Metais P, Montagnier L, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Beretta A. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998; 351: 14-8.

Rabin RL, Park MK, Liao F, Swofford R, Stephany D, Farber JM. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol* 1999; 162: 3840-50.

Rana S, Besson G, Cook DG, Rucker J, Smyth RJ, Yi Y, Turner JD, Guo HH, Du JG, Peiper SC, Lavi E, Samson M, Libert F, Liesnard C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M, Collman RG. Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J Virol* 1997; 71: 3219-27.

Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Forster R, Cyster JG. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 2002; 416: 94-9.

Reubel GH, Dean GA, George JW, Barlough JE, Pedersen NC. Effects of incidental infections and immune activation on disease progression in experimentally feline immunodeficiency virus-infected cats. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994a; 7: 1003-15.

Reubel GH, George JW, Higgins J, Pedersen NC. Effect of chronic feline immunodeficiency virus infection on experimental feline calicivirus-induced disease. *Vet Microbiol* 1994b; 39: 3-4.

Richardson J, Pancino G, Merat R, Leste Lasserre T, Moraillon A, Schneider Mergener J, Alizon M, Sonigo P, Heveker N. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by primary and laboratory-adapted strains of feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1999; 73: 3661-71.

Rigby MA, Holmes EC, Pistello M, Mackay A, Brown AJL, Neil JC, Leigh Brown AJ. Evolution of structural proteins of feline immunodeficiency virus: molecular epidemiology and evidence of selection for change. *J Gen Virol* 1993; 74: 425-36.

Robey E, Axel R. CD4: Collaborator in Immune Recognition and HIV Infection. *Cell* 1990; 60: 697-700.

Rosen CA, Terwilliger E, Dayton A, Sodroski JG, Haseltine WA. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 2071-5.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42.

Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dymbul M, Machado E, Cohn MA, Hoxie JA, Murphy PM, Fauci AS, Weissman D. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol* 1998; 160: 3933-41.

Rucker J, Edinger AL, Sharron M, Samson M, Lee B, Berson JF, Yi Y, Margulies B, Collman RG, Doranz BJ, Parmentier M, Doms RW. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus- encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 1997; 71: 8999-9007.

Sabine M, Michelsen J, Thomas F, Zheng M. Feline AIDS. *Australian Veterinary Practitioner* 1988; 18: 105-7.

Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OMZ, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells. In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α . *Am J Pathol* 1999; 154: 1125-35.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998a; 187: 875-83.

Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998b; 28: 2760-9.

Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* 1999a; 29: 2037-45.

Sallusto F, Palermo B, Hoy A, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999b; 246: 123-8.

Salzwedel K, Berger EA. Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12794-9.

Schols D, Este Jose A, Henson G, De Clercq E. Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res* 1997a; 35: 147-56.

Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este Jose A, Henson G, De Clercq E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* 1997b; 186: 1383-8.

Schols D. Promising anti-HIV therapeutic strategy with a small molecule CXCR4 antagonist. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1999; 61: 551-64.

Schols D, Claes S, Hatse S, Princen K, Vermeiere K, De Clercq E, Skerlj RT, Bridger G, Calandra G. Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist. In: 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA 2003: 1.

Schwarz M, Murphy PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF-kappa B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. *J Immunol* 2001; 167: 505-13.

Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Non-peptidic chemokine receptors antagonists as emerging anti-HIV agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2002; 17: 69-76.

Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, Nasorri F, Bianchi G, Traidl C, Sozzani S, Girolomoni G, Cavani A. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 2001; 166: 996-1002.

Shelton GH, Waltier RM, Connor SC, Grant CK. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in pet cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1989; 25: 7-12.

Sherman L, Yaniv A, Lichtman-Pleban H, Tronick SR, Gazit A. Analysis of regulatory elements of the equine infectious anemia virus and caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeats. *J Virol* 1989; 63: 4925-31.

Shioda T, Nakayama EE, Tanaka Y, Xin X, Liu H, Kawana-Tachikawa A, Kato A, Sakai Y, Nagai Y, Iwamoto A. Naturally occurring deletional mutation in the C-terminal cytoplasmic tail of CCR5 affects surface trafficking of CCR5. *J Virol* 2001; 75: 3462-8.

Shiraishi M, Aramaki Y, Seto M, Imoto H, Nishikawa Y, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Nishimura O, Baba M, Fujino M. Discovery of novel, potent, and selective small-molecule CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: synthesis and biological evaluation of anilide derivatives with a quaternary ammonium moiety. *J Med Chem* 2000; 43: 2049-63.

Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995; 28: 495-500.

Sodora DI, Shpaer EG, Kitchell BE, Dow SW, Hoover EA, Mullins JI. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *J Virol* 1994; 68: 2230-8.

Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzmann D, Cole S, Danos O, Retzel E, Tiollais P, Haase A, Wain-Hobson S. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 1985; 42: 369-82.

Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, D'Amico G, Power CA, Wells TN, Gobbi M, Allavena P, Mantovani A. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 1997; 159: 1993-2000.

Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* 1999a; 66: 1-9.

Sozzani S, Mantovani A, Allavena P. Control of dendritic cell migration by chemokines. *Forum (Genova)* 1999b; 9: 325-38.

Sparger EE, Luciw PA, Elder JH, Yamamoto JK, Lowenstine LJ, Pedersen NC. Feline immunodeficiency virus is a lentivirus associated with an AIDS-like disease in cats. *Aids* 1989; 3 Suppl 1: S43-9.

Sparkes AH, Hopper CD, Millard WG, Gruffydd Jones TJ, Harbour DA. Feline immunodeficiency virus infection. Clinicopathologic findings in 90 naturally occurring cases. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 85-90.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.

Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 827-72.

Steinman R, Dombrowski J, O'Connor T, Montelaro RC, Tonelli Q, Lawrence K, Seymour C, Goodness J, Pedersen NC, Andersen PR. Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1990; 71: 701-6.

Stengel C, Berrocal A, Chabchoub A, Dodurka T, Hartmann K. Prävalenz der feline Immunschwächevirusinfektion bei Katzen in Tunesien, Costa Rica und der Türkei. In: 10. Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische Laboratoriumsdiagnostik", München 2001.

Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Dean M, et al. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1507-15.

Strizki JM, Xu S, Wagner NE, Wojcik L, Liu J, Hou Y, Endres M, Palani A, Shapiro S, Clader JW, Greenlee WJ, Tagat JR, McCombie S, Cox K, Fawzi AB, Chou CC, Pugliese Sivo C, Davies L, Moreno ME, Ho DD, Trkola A, Stoddart CA, Moore JP, Reyes GR, Baroudy BM. SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12718-23.

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa SI, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998; 393: 591-4.

Talbott RL, Sparger EE, Lovelace KM, Fitch WM, Pedersen NC, Luciw PA, Elder JH. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 5743-7.

Tamamura H, Xu Y, Hattori T, Zhang X, Arakaki R, Kanbara K, Omagari A, Otaka A, Ibuka T, Yamamoto N, Nakashima H, Fujii N. A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: A strong anti-HIV peptide T140. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 877-82.

Tamamura H, Omagari A, Oishi S, Kanamoto T, Yamamoto N, Peiper SC, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10: 2633-7.

Tanaka R, Yoshida A, Murakami T, Baba E, Lichtenfeld J, Omori T, Kimura T, Tsurutani N, Fujii N, Wang ZX, Peiper SC, Yamamoto N, Tanaka Y. Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection. *J Virol* 2001; 75: 11534-43.

Tang H, Kuhen KL, Wong-Staal F. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 133-70.

Tenorio AP, Franti CE, Madewell BR, Pedersen NC. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viruses. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 29: 1-2.

Thompson FJ, Elder J, Neil JC. Cis- and trans-regulation of feline immunodeficiency virus: Identification of functional binding sites in the long terminal repeat. *J Gen Virol* 1994; 75: 545-54.

Tilley LP. EKG bei Hund und Katze. Schlütersche GmbH, Hannover 1997, 483.

Tomonaga K, Norimine J, Shin YS, Fukasawa M, Miyazawa T, Adachi A, Toyosaki T, Kawaguchi Y, Kai C, Mikami T. Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. *J Virol* 1992; 66: 6181-5.

Tomonaga K, Shin YS, Fukasawa M, Miyazawa T, Adachi A, Mikami T. Feline immunodeficiency virus gene expression: Analysis of the RNA splicing pattern and the monocistronic rev mRNA. *J Gen Virol* 1993; 74: 2409-17.

Topping R, Demoitie MA, Shin NH, Telesnitsky A. Cis-acting elements required for strong stop acceptor template selection during Moloney murine leukemia virus reverse transcription. *J Mol Biol* 1998; 281: 1-15.

Tremblay CL, Giguel F, Kollmann C, Guan Y, Chou TC, Baroudy BM, Hirsch MS. Anti-human immunodeficiency virus interactions of SCH-C (SCH 351125), a CCR5 antagonist, with other antiretroviral agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1336-9.

Trkola A, Ketas TJ, Nagashima KA, Zhao L, Cilliers T, Morris L, Moore JP, Maddon PJ, Olson WC. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol* 2001; 75: 579-88.

Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, Pugach P, Xu S, Wojcik L, Tagat J, Palani A, Shapiro S, Clader JW, McCombie S, Reyes GR, Baroudy BM, Moore JP. HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 395-400.

Tsai CC, Follis KE, Sabo A, Grant R, Bischofberger N. Efficacy of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine treatment against chronic simian immunodeficiency virus infection in macaques. *J Infect Dis* 1995; 171: 1338-43.

Tsai CC, Emau P, Sun JC, Beck TW, Tran CA, Follis KE, Bischofberger N, Morton WR. Post-exposure chemoprophylaxis (PECP) against SIV infection of macaques as a model for protection from HIV infection. *J Med Primatol* 2000; 29: 248-58.

Tudan C, Willick GE, Chahal S, Arab L, Law P, Salari H, Merzouk A. C-terminal cyclization of an SDF-1 small peptide analogue dramatically increases receptor affinity and activation of the CXCR4 receptor. *J Med Chem* 2002; 45: 2024-31.

Ugolini S, Moulard M, Mondor I, Barois N, Demandolx D, Hoxie J, Brelot A, Alizon M, Davoust J, Sattentau QJ. HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 1997; 159: 3000-8.

Vahlenkamp T. Efficacy of antiviral agents against feline immunodeficiency virus in vitro and in experimentally infected cats. 1993; 95.

Vahlenkamp TW, De Ronde A, Balzarini J, Naesens L, De Clercq E, Van Eijk MJT, Horzinek MC, Egberink HF. (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurine is a potent inhibitor of feline immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 746-9.

Vahlenkamp TW, Verschoor EJ, Schuurma N, Van Vliet ALW, Horzinek MC, Egberink HF, De Ronde A. A single amino acid substitution in the transmembrane envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus alters cellular tropism. *J Virol* 1997; 71: 7132-5.

Vahlenkamp TW, Ronde Ad, Schuurman N, Vliet ALWv, Drunen Jv, Horzinek MC, Egberink HF, de Ronde A, van Vliet ALW, van Drunen J. Envelope gene sequences encoding variable regions 3 and 4 are involved in macrophage tropism of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1999; 80: 2639-46.

van der Meer P, Ulrich Anthony M, Gonzalez Scarano F, Lavi E. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: Potential mechanisms for HIV dementia. *Exp Mol Pathol* 2000; 69: 192-201.

van Os R, Schols D, Struyf S, De Clercq E, Willemze R, Fibbe Wim E. The CXCR4 receptor antagonist AMD3100 does not prevent homing and engraftment of murine syngeneic bone marrow stem cells. *Blood* 2000; 96: 308b.

Venkatesan S, Petrovic A, Van Ryk DI, Locati M, Weissman D, Murphy PM. Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5Delta 32 heterozygotes is mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration. *J Biol Chem* 2002; 277: 2287-301.

Verschoor EJ, Hulskotte EG, Ederveen J, Koolen MJ, Horzinek MC, Rottier PJ. Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. *Virology* 1993; 193: 433-8.

Vicente MM, Montoya MC, Mellado M, Frade JM, del Pozo MA, Nieto M, de Landazuri MO, Martinez A C, Sanchez Madrid F. The chemokine SDF-1alpha triggers a chemotactic response and induces cell polarization in human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2197-207.

Vink C, Van Der Linden Karin H, Plasterk Ronald HA. Activities of the feline immunodeficiency virus integrase protein produced in *Escherichia coli*. *J Virol* 1994; 68: 1468-74.

Voevodin A, Samilchuk E, Dashti S. Frequencies of SDF-1 chemokine, CCR-5, and CCR-2 chemokine receptor gene alleles conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 and AIDS in Kuwaitis. *J Med Virol* 1999; 58: 54-8.

Walker C, Canfield P. Haematological findings in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Comp Haematol Int* 1996; 6: 77-85.

Walker C, Canfield PJ, Love DN, McNeil DR. A longitudinal study of lymphocyte subsets in a cohort of cats naturally-infected with feline immunodeficiency virus. *Australian Veterinary Journal* 1996; 73: 218-24.

Wang W, Soto H, Oldham ER, Buchanan ME, Homey B, Catron D, Jenkins N, Copeland NG, Gilbert DJ, Nguyen N, Abrams J, Kershenovich D, Smith K, McClanahan T, Vicari AP, Zlotnik A. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* 2000; 275: 22313-23.

Ward SG, Westwick J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem J* 1998; 333: 457-70.

Weng Y, Siciliano SJ, Waldburger KE, Sirotina-Meisher A, Staruch MJ, Daugherty BL, Gould SL, Springer MS, DeMartino JA. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 18288-91.

Whitwam T, Peretz M, Poeschla E. Identification of a central DNA flap in feline immunodeficiency virus. *J Virol* 2001; 75: 9407-14.

Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, Briskin M. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol* 2001; 166: 5145-54.

Wilhelm N. Vergleichende Untersuchung zum therapeutischen Einsatz von (R)-9-(2-Phosphonymethoxypropyl)-2,6-diaminopurin (PMPDAP) und Mellitin bei natürlich FIV-infizierten Katzen. Diss. med. vet., München, 1996.

Willard MD, Tvedten H. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. Harcourt Publishers Ltd, a subsidiary of Harcourt Inter, 1999, 410.

Willett B, Hosie M, Shaw A, Neil J. Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J Gen Virol* 1997a; 78: 611-8.

Willett BJ, Hosie MJ, Dunsford TH, Neil JC, Jarrett O. Productive infection of T-helper lymphocytes with feline immunodeficiency virus is accompanied by reduced expression of CD4. *AIDS* 1991; 5: 1469-75.

Willett BJ, Picard L, Hosie MJ, Turner JD, Adema K, Clapham PR. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by the feline and human immunodeficiency viruses. *J Virol* 1997b; 71: 6407-15.

Willett BJ, Adema K, Heveker N, Brelot A, Picard L, Alizon M, Turner JD, Hoxie JA, Peiper S, Neil JC, Hosie MJ. The second extracellular loop of CXCR4 determines its function as a receptor for feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1998; 72: 6475-81.

Williamson C, Loubser SA, Brice B, Joubert G, Smit T, Thomas R, Visagie M, Cooper M, van der Ryst E. Allelic frequencies of host genetic variants influencing susceptibility to HIV-1 infection and disease in South African populations. *AIDS* 2000; 14: 449-51.

Withers-Ward ES, Kitamura Y, Barnes JP, Coffin JM. Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration in vivo. *Genes Dev* 1994; 8: 1473-87.

Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem* 1997; 272: 1038-45.

Xia MQ, Hyman BT. Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 1999; 5: 32-41.

Xiao L, Rudolph DL, Owen SM, Spira TJ, Lal RB. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXC-chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. *AIDS* 1998; 12: 137-43.

Xu Y, Tamamura H, Arakaki R, Nakashima H, Zhang X, Fujii N, Uchiyama T, Hattori T. Marked increase in anti-HIV activity, as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4, linked to enhancement of the binding ability of tachyplesin analogs to CXCR4. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 419-27.

Yamamoto JK, Sparger E, Ho EW, Andersen PR, O' Connor TP, Mandell CP, Lowenstine L, Munn R, Pedersen NC. Pathogenesis of Experimentally Induced Feline Immunodeficiency Virus Infection in Cats. *Am J Vet Res* 1988; 49: 1246-58.

Yamamoto JK, Hansen H, Ho EW, Morishita TY, Okuda T, Sawa TR, Nakamura RM, Pedersen NC. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194: 213-20.

Yanagawa Y, Onoe K. CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant upregulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood* 2003.

Yang D, Howard OM, Chen Q, Oppenheim JJ. Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J Immunol* 1999; 163: 1737-41.

Yi Y, Rana S, Turner Julie D, Gaddis N, Collman Ronald G. CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 72: 772-7.

Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 634-44.

Youn BS, Zhang SM, Lee EK, Park DH, Broxmeyer HE, Murphy PM, Locati M, Pease JE, Kim KK, Antol K, Kwon BS. Molecular cloning of leukotactin-1: a novel human beta-chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3. *J Immunol* 1997; 159: 5201-5.

Youn BS, Kim YJ, Mantel C, Yu KY, Broxmeyer HE. Blocking of c-FLIP(L)--independent cycloheximide-induced apoptosis or Fas-mediated apoptosis by the CC chemokine receptor 9/TECK interaction. *Blood* 2001; 98: 925-33.

Yousefi S, Cooper PR, Potter SL, Mueck B, Jarai G. Cloning and expression analysis of a novel G-protein-coupled receptor selectively expressed on granulocytes. *J Leukocyte Biol* 2001; 69: 1045-52.

Zack JA, Arrigo SJ, Chen IS. Control of expression and cell tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Adv Virus Res* 1990; 38: 125-46.

Zack JA, Haislip AM, Krogstad P, Chen IS. Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *J Virol* 1992; 66: 1717-25.

Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997; 3: 1369-75.

Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, Tiffany HL, Farber JM, Peden KW, Murphy PM, Golding H. CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 1998; 161: 3103-13.

Zhang L, Carruthers CD, He T, Huang Y, Cao Y, Wang G, Hahn B, Ho DD. HIV type 1 subtypes, coreceptor usage, and CCR5 polymorphism. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13: 1357-66.

Zhang L, He T, Talal A, Wang G, Frankel SS, Ho DD. In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J Virol* 1998a; 72: 5035-45.

Zhang S, Youn BS, Gao JL, Murphy PM, Kwon BS. Differential effects of leukotactin-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha on neutrophils mediated by CCR1. *J Immunol* 1999; 162: 4938-42.

Zhang WB, Navenot JM, Haribabu B, Tamamura H, Hiramatsu K, Omagari A, Pei G, Manfredi JP, Fujii N, Broach JR, Peiper SC. A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists. *J Biol Chem* 2002; 277: 24515-21.

Zhang YJ, Dragic T, Cao Y, Kostrikis L, Kwon DS, Littman DR, Kewalramani VN, Moore JP. Use of coreceptors other than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of human immunodeficiency virus type 1 is rare in vitro. *J Virol* 1998b; 72: 9337-44.

Zhang YJ, Lou B, Lal RB, Gettie A, Marx PA, Moore JP. Use of inhibitors to evaluate coreceptor usage by simian and simian/human immunodeficiency viruses and human immunodeficiency virus type 2 in primary cells. *J Virol* 2000; 74: 6893-6910.

Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 1998; 160: 4018-25.

Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999; 19: 1-47.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-7.

Zoffmann S, Chollet A, Galzi JL. Identification of the extracellular loop 2 as the point of interaction between the N terminus of the chemokine MIP-1alpha and its CCR1 receptor. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 729-36.

Zou YR, Kottman AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; 393: 595-9.

VIII. Anhang**Untersuchungsgang für FIV-Katzen****Besitzer:**

Name	Vorname	Adresse	Telefon
------	---------	---------	---------

Patient:

Nummer	Name	Geburtsdatum	Geschlecht
--------	------	--------------	------------

Behandlungszeitpunkt:

Therapiebeginn:

Therapieende:

1. Allgemeinuntersuchung:

1.1. Allgemeinbefinden:	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
-------------------------	--------	---	----	----	----	----	----

(0 – 10)

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

1.2. Verhalten:	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
-----------------	--------	---	----	----	----	----	----

(+ / -)

apathisch	—	—	—	—	—	—	—
-----------	---	---	---	---	---	---	---

matt	—	—	—	—	—	—	—
------	---	---	---	---	---	---	---

ruhig	—	—	—	—	—	—	—
-------	---	---	---	---	---	---	---

aufmerksam	—	—	—	—	—	—	—
------------	---	---	---	---	---	---	---

lebhaft	—	—	—	—	—	—	—
---------	---	---	---	---	---	---	---

aufgeregt	—	—	—	—	—	—	—
-----------	---	---	---	---	---	---	---

ängstlich	—	—	—	—	—	—	—
-----------	---	---	---	---	---	---	---

zutraulich	—	—	—	—	—	—	—
------------	---	---	---	---	---	---	---

aggressiv	—	—	—	—	—	—	—
-----------	---	---	---	---	---	---	---

Karnofsky-Index:	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(0 – 100 %)	—	—	—	—	—	—	—

1.3. Ernährungszustand:	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(+ / -)							

adipös	—	—	—	—	—	—	—
--------	---	---	---	---	---	---	---

gut	—	—	—	—	—	—	—
-----	---	---	---	---	---	---	---

normal	—	—	—	—	—	—	—
--------	---	---	---	---	---	---	---

mager	—	—	—	—	—	—	—
-------	---	---	---	---	---	---	---

lebhaft	—	—	—	—	—	—	—
---------	---	---	---	---	---	---	---

kachektisch	—	—	—	—	—	—	—
-------------	---	---	---	---	---	---	---

- Körpermasse (in kg)	—	—	—	—	—	—	—
-----------------------	---	---	---	---	---	---	---

1.4. Pflegezustand:	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(+ / -)							

gut	—	—	—	—	—	—	—
-----	---	---	---	---	---	---	---

mäßig	—	—	—	—	—	—	—
-------	---	---	---	---	---	---	---

schlecht	—	—	—	—	—	—	—
----------	---	---	---	---	---	---	---

1.5. Entwicklungszustand:

Alter und Rasse entsprechend O

abweichend O

1.6. Körpertemperatur:	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(in ° C)	—	—	—	—	—	—	—

1.7. Atemfrequenz:	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(Atemzüge / Minute)	—	—	—	—	—	—	—

1.8. Herzfrequenz:

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

(Schläge / Minute)

— — — — — — —

2. Spezielle Untersuchung:**2.1. Haarkleid:**

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

(+ / -)

fettig

— — — — — — —

schuppig

— — — — — — —

(0 – 10)

Dichte

— — — — — — —

Glanz

— — — — — — —

Haarstand

— — — — — — —

2.2. Haut:

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

(+ / -)

schuppig

— — — — — — —

fettig

— — — — — — —

trocken

— — — — — — —

Hauttemperatur

physiologisch O

verändert O

- Parasiten

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

(0 - 10)

Stärke

— — — — — — —

Ausdehnung

— — — — — — —

- Pilze

(0 – 10)

Stärke

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

Ausdehnung

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

- Entzündung

(0 – 10)

Stärke

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

Ausdehnung

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

2.3. Unterhaut:**- Dehydratation**

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

(0 – 10)

Stärke

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

Ausdehnung

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

- Ödeme

(+ / -)

lokal

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

diffus

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

2.4. Ohren:

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

- Parasiten

(0 - 10)

Stärke

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

Ausdehnung

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

- Entzündung

(0 – 10)

Stärke

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

Ausdehnung

—	—	—	—	—	—	—	—
---	---	---	---	---	---	---	---

2.5. Maulschleimhaut:

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

(+ / -)

rosa	—	—	—	—	—	—	—
blaßrosa	—	—	—	—	—	—	—
weiß	—	—	—	—	—	—	—
porzellanfarben	—	—	—	—	—	—	—
gerötet	—	—	—	—	—	—	—
gelblich	—	—	—	—	—	—	—
gelb	—	—	—	—	—	—	—
bläulich	—	—	—	—	—	—	—
verwaschen	—	—	—	—	—	—	—

2.6. Augen:

- Konjunktiven

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

(+ / -)

rosa	—	—	—	—	—	—	—
blaßrosa	—	—	—	—	—	—	—
weiß	—	—	—	—	—	—	—
porzellanfarben	—	—	—	—	—	—	—
gerötet	—	—	—	—	—	—	—

(0 – 10)

Rötung	—	—	—	—	—	—	—
Schwellung	—	—	—	—	—	—	—

- Augenausfluß

Tag: 1 8 15 22 29 36 43

Quantität (1 – 10)

— — — — — — —

Qualität:

serös (2)	—	—	—	—	—	—	—
seromukös (4)	—	—	—	—	—	—	—

mukös (6)	—	—	—	—	—	—	—
mukopurulent (8)	—	—	—	—	—	—	—
purulent (10)	—	—	—	—	—	—	—

- Lider	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(+ / -)							
verklebt	—	—	—	—	—	—	—
geschwollen	—	—	—	—	—	—	—
symmetrisch	—	—	—	—	—	—	—
Blepharospasmus	—	—	—	—	—	—	—

- Kornea	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
----------	--------	---	----	----	----	----	----

Trübung:

(0 - 10)

Stärke	—	—	—	—	—	—	—
Ausdehnung	—	—	—	—	—	—	—

Ulcus:

(0 – 10)

Stärke	—	—	—	—	—	—	—
Ausdehnung	—	—	—	—	—	—	—

- Pupillarreflex:

physiologisch O

verändert O

- Linse

Linsenluxation O

Linse getrübt O

vordere Synechie O

hintere Synechie O

2.7. Lymphknoten:

- Lnn. mandibulares (+ / -)	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
o. b .B.	—	—	—	—	—	—	—
verschieblich	—	—	—	—	—	—	—
schmerzhaft	—	—	—	—	—	—	—
Größe (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—

Form / Besonderheiten:

- Lnn. cervicales superficiales (+ / -)	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
o. b. B.	—	—	—	—	—	—	—
verschieblich	—	—	—	—	—	—	—
schmerzhaft	—	—	—	—	—	—	—
Größe (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—

Form / Besonderheiten:

- Lnn. poplitei (+ / -)	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
o. b. B.	—	—	—	—	—	—	—
verschieblich	—	—	—	—	—	—	—
schmerzhaft	—	—	—	—	—	—	—
Größe (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—

Form / Besonderheiten:

- Lnn. _____	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(+ / -)							
o. b. B.	—	—	—	—	—	—	—
verschieblich	—	—	—	—	—	—	—
schmerzhaft	—	—	—	—	—	—	—
Größe (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—

Form / Besonderheiten:

2.8. Kreislaufsystem:

- Herzauskultation	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(+ / -)							
regelmäßig	—	—	—	—	—	—	—
gleichmäßig	—	—	—	—	—	—	—
abgesetzt	—	—	—	—	—	—	—
Herzgeräusche	—	—	—	—	—	—	—
Intensität:							
schwach	—	—	—	—	—	—	—
kräftig	—	—	—	—	—	—	—
pochend	—	—	—	—	—	—	—

- Pulsqualität	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(+ / -)							
regelmäßig	—	—	—	—	—	—	—
gleichmäßig	—	—	—	—	—	—	—
nicht fühlbar	—	—	—	—	—	—	—
schwach	—	—	—	—	—	—	—
kräftig	—	—	—	—	—	—	—
pochend	—	—	—	—	—	—	—

- Gefäßfüllung (0 - 10)	—	—	—	—	—	—	—
- Gefäßspannung (0 - 10)	—	—	—	—	—	—	—
- Kapillarfüllungszeit (in sec)	—	—	—	—	—	—	—

2.9. Atmungsapparat

- Nasenausfluß	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
Quantität (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—
Qualität:							
serös (2)	—	—	—	—	—	—	—
seromukös (4)	—	—	—	—	—	—	—
mukös (6)	—	—	—	—	—	—	—
mukopurulent (8)	—	—	—	—	—	—	—
purulent (10)	—	—	—	—	—	—	—
- Atmung	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
Atemtyp:							
(+ / -)							
costal	—	—	—	—	—	—	—
costoabdominal	—	—	—	—	—	—	—
abdominal	—	—	—	—	—	—	—
Rhythmus:							
regelmäßig	—	—	—	—	—	—	—
Intensität:							
flach	—	—	—	—	—	—	—
vertieft	—	—	—	—	—	—	—
pumpend	—	—	—	—	—	—	—

Maulatmung	—	—	—	—	—	—	—
Husten auslösbar	—	—	—	—	—	—	—

2.10. Verdauungstrakt

- Speichelfluß (+ / -) vermehrt	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
	—	—	—	—	—	—	—
- Foetor ex ore (+ / -)	—	—	—	—	—	—	—
- Zahnstein (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—
- Stomatitis (0 – 10) Stärke Ausdehnung	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—
- Gingivitis (0 – 10) Stärke Ausdehnung	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—
- Glossitis (0 – 10) Stärke Ausdehnung	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—
- Vomitus	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
Menge (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—
Häufigkeit (/Tag, /Woche)	—	—	—	—	—	—	—
Beschaffenheit: verdaut	—	—	—	—	—	—	—

wäßrig	—	—	—	—	—	—	—
schleimig	—	—	—	—	—	—	—
schaumig	—	—	—	—	—	—	—
gallig	—	—	—	—	—	—	—
blutig	—	—	—	—	—	—	—
Geruch:							
sauer	—	—	—	—	—	—	—
bitter (gallig)	—	—	—	—	—	—	—
geruchlos	—	—	—	—	—	—	—
- Kotabsatz	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
(+ / -)							
physiologisch	—	—	—	—	—	—	—
Durchfall	—	—	—	—	—	—	—
Farbveränderungen:							
senffarben	—	—	—	—	—	—	—
Meläna	—	—	—	—	—	—	—
Blutspuren	—	—	—	—	—	—	—
Durchfall:							
Häufigkeit (/Tag)	—	—	—	—	—	—	—
Beschaffenheit:							
pastös (2)	—	—	—	—	—	—	—
breiig (4)	—	—	—	—	—	—	—
dünnbreiig (6)	—	—	—	—	—	—	—
flüssig (8)	—	—	—	—	—	—	—
blutig (10)	—	—	—	—	—	—	—

2.11. Abdomen (Palpation)

	Tag: 1	8	15	22	29	36	43
- Bauchdeckenspannung (0 – 10)	—	—	—	—	—	—	—
- Bauchhöhlenorgane verändert (+ / -)							
Leber	—	—	—	—	—	—	—
Nieren	—	—	—	—	—	—	—
Milz	—	—	—	—	—	—	—
Darm	—	—	—	—	—	—	—
Koprostase	—	—	—	—	—	—	—

Genaue Beschreibung:

Danksagung

Herrn Prof. W. Kraft möchte ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in die Klinik und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel danken.

Frau Priv. Doz. Dr. Katrin Hartmann danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, für die fachliche und jegliche andere Unterstützung, die Vermittlung vieler Kontakte, das freundschaftliche Arbeitsverhältnis und das große Vertrauen.

Meinen Mitdoktoranden und Kollegen in der Klinik danke ich für die gute Zusammenarbeit, die praktische und moralische Unterstützung. Vielen von ihnen sind Freunde geworden und ich hoffe wir werden noch einige Jahre miteinander arbeiten..

Den Tierpflegern möchte ich danken, für die Geduld und Sorgfalt bei der Betreuung der Katzen und die immerwährende Hilfe, auch bei unwilligen Patienten.

Bei Herrn Prof. J. Balzarini bedanke ich mich für die Bereitstellung und die Kodierung der Medikamente, die freundliche Unterstützung und die geistigen Anregungen.

Herrn Dr. G. Henson möchte ich für die Überlassung des Bizyklams danken.

Herrn Dr. D. Klein und seinen Mitarbeitern danke ich für die Durchführung der real-time-PCR und für die Vermittlung des Wissens über PCR-Methoden.

Herrn Dr. H. Egberink möchte danken ich für die Untersuchung der Resistenzentwicklung und für die freundschaftliche Hilfe bei allen Fragen.

Mein Dank gilt auch den Tierärzten und Tierheimen für die Einsendung der Serumproben und die Hilfe bei der Vermittlung von Patienten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danken möchte ich auch den Katzenbesitzern, die sich oft nur schwer von ihren kleinen und großen Stubentigern trennen konnten und allen Studenten, die die Katzen zuhause versorgt oder eine Patenschaft übernommen haben. Ich hoffe sie haben noch lange Freude mit ihren Katzen. Bedanken möchte ich mich auch bei den Katzen, die mehr oder auch weniger freiwillig die Untersuchungen über sich ergehen ließen.

Außerdem möchte ich meinen Kollegen und Freunden danken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben. Vielen Dank für eure Hilfe, sowohl bei der fachlichen und menschlichen Unterstützung als auch der Betreuung meines Minni-Hundes, die sonst vor Langeweile völlig verzweifelt wäre. Besonders danke Claudi Salzborn und Sabine Gleich für die unermüdliche und kreative Korrekturarbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, in besonderem Maße bei meiner Mutter, ihre Liebe und Unterstützung bedeutet mir sehr viel und war und wird mir immer eine Hilfe sein. Meinem Bruder Florian danke ich für seine Geduld bei all den kleinen Problemen.

Lebenslauf

Name:	Christiane Stengel
Geburtsdatum:	5. Januar 1970
Geburtsort:	Merzig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Dr. Antje Erichsen, geb. Rüdenholz, Anästhesistin Dr. Peter Stengel, Chirurg
Geschwister:	Martin Stengel, geb. am 19. August 1966 Florian Stengel, geb. am 28. März 1977
Schulausbildung:	
1976 - 1978	Grundschule Wollmatingen, Konstanz
1978 - 1980	Grundschule Kloster Zoffingen, Konstanz
1980 - 1985	Alexander-von-Humboldt Gymnasium, Konstanz
1985 - 1989	Otto-Hahn-Gymnasium, Tuttlingen
25.4.1989	Allgemeine Hochschulreife
Universitätsausbildung:	
1989 - 1992	Studium der Diplom - Biologie an der Universität Konstanz
1992 – 1997	Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
21. Januar 1998	Approbation als Tierärztin
1. Februar 1998	Beginn der Dissertation an der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeitsleben:	
1998 - 2001	Tierärztliche Tätigkeit als wissenschaftlichen Hilfskraft Drittmittelvertrag
seit 2001	Assistentztierärztin in der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Resident des European College of Veterinary Internal Medicine